

сенсорными характеристиками.

целенаправленно модифицированных гликозидов с заранее прогнозируемыми особенностями и вкусовыми качествами этих веществ с целью создания отношения очень важно выявить взаимосвязь между структурными трансгликозилирования под действием различных ферментов. В этом модификацией исходных соединений с помощью реакции межмолекулярного остаточными горечью и послевкусием. Эти недостатки можно снять Стевия до 450 раз слаще, чем обычный сахар, однако обладает

актуальной и острой необходимостью. организм и могут быть использованы в пищевой промышленности, является растительного происхождения, которые безвредны для человеческого В этой связи поиск естественных и низкокалорийных подсластителей другим серьезным заблуждением.

ведет к ожирению, развитию сахарного диабета, сердечно-сосудистым и снижению иммунитета, к нарушению обмена веществ. А это в свою очередь может привести к недостатку в организме минералов и витаминов, к на организм благодаря его высокой калорийности и легкой усвояемости, и важных проблем здоровья питания. Сахар оказывает негативное воздействие В настоящее время высокое потребление сахара является одной из

#### Актуальность темы

Ведущей организации на диссертационную работу Чхан Кристины Викторовны на тему «Улучшение вкусовых характеристик гликозидов стевии (*Stevia rebaudiana Bertoni*) методом ферментативной биотрансформации» по специальности «Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук

#### О Т З Ы В

ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ПИТАНИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ И  
БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ

(ФГБН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14

Тел. +7(495) 698-53-60; факс: +7(495) 698-53-79

ОКПО 01897222 ОФРН 1027739311907

ИНН 7705004254 КПП 770501001

E-mail: mailbox@ion.ru Сайт: www.ion.ru

02.09.2019 № 410-В-02/857



2019 г.

Никиток Д.Б.

доктор медицинских наук, профессор

член-корреспондент РАН,

«ФИЦ питания и биотехнологии»

Директор ФГБН

«УТВЕРЖДАЮ»

Диссертационная работа Чхан Кристины Викторовны, несомненно, является актуальной и посвящена получению и усовершенствованию вкуса природных высококонцентрированных подсластителей, которыми являются сладкие гликозиды *Stevia rebaudiana* (стевия).

В рамках этой проблемы автором научно обоснованы направления исследований, сформулирована тема диссертационной работы и определена методология решения этих актуальных задач.

### **Степень обоснованности научных положений и выводов**

В ходе проведения исследований Чхан К.В. использовала современные методы анализа, в результате чего был получен обширный экспериментальный материал. Научные положения, выводы и рекомендации, изложенные в диссертации, логично обоснованы, подтверждены обширным экспериментальным материалом и математическими расчетами. В работе отсутствуют противоречащие положения и выводы.

Основные положения, выводы и рекомендации успешно апробированы соискателем на научных международных конференциях.

### **Научная новизна работы Чхан К.В. заключается в том, что**

- выявлены оптимальные условия трансглюкозилирования гликозидов стевии ребаудиозида (Reb) A, RebD и RebM, в результате проведения сравнительных исследований по трансглюкозилированию с помощью ферментов пикломальтодекстрин глюконотрансферазы (ПГТаз) и  $\beta$ -фруктофуранозидазы (ФФазы);

- разработаны методы выделения и очистки моно-, ди- и три-гликозилированных гликозилированных RebA, RebD и RebM и сравнительно охарактеризованы их вкусовые качества;

- установлены особенности очистки моно-, ди- и три-гликозилированных производных RebA, RebD и RebM на основе их сродства к макропористому носителю, и сравнительно охарактеризованы их сенсорные характеристики;

- выявлена связь между строением гликозидов и вкусовыми характеристиками модифицированных и немодифицированных гликозидов стевии.

### **Практическая значимость работы**

Практическая значимость работы подтверждена четырьмя патентами на изобретения. На сегодняшний день природный некалорийный сахарозаменитель является необходимой для пищевой промышленности и может быть использован при приготовлении напитков и различных пищевых продуктов.

В этой связи все большей популярностью пользуется *Stevia Rebaudiana* (стевия), которая аккумулирует ряд сладких гликозидов, не обладающих побочными действиями.



## Структура и содержание диссертационной работы

Структура диссертационной работы включает в себя введение, обзор литературы, экспериментальную часть, состоящую из четырёх глав, заключение, выводы, список использованной литературы, включающего 178 источников, из них 160 зарубежных, список сокращений и приложений. Во «введении» обоснована актуальность диссертационной работы, показана необходимость получения новых природных заменителей сахара. Обозначена научная новизна. Определены цель и основные задачи исследования.

В первой главе «*Обзор литературы*» систематизированы результаты анализа материалов научно-технической информации, затрагивающие вопросы решения проблемы сахарозаменителей. Рассмотрены строение и свойства растения *Stevia rebaudiana* Bertoni (стевия). Экстракт стевии содержит смесь различных diterпеновых гликозидов, которые имеют единую основу – стевиол и отличаются содержанием углеводных остатков в положении C-13 и C-19. Выделены и идентифицированы стевиозид, РеbА, В, С, D и E, дулкозид-А, рубузозид и стевиолбиозид. Все они обладают повышенной сладостью и имеют остаточную горечь и послевкусие, которые лимитируют сферы их применения и делают затруднительными создание рецептур пищевых продуктов и напитков. Рассмотрены способы выделения и очистки гликозидов стевии. Рассмотрены основные свойства гликозидов стевии РеbА, РеbD и РеbM их стабильность и биологические свойства.

На основании изученной научно-технической литературы автором установлено, что несмотря на широкое распространение стевии и ее использование взамен сахара, вкус стевии гликозидов растения изучен недостаточно; выделены далеко не все соединения этой группы, поэтому следовало изучить вкус сладких минеральных гликозидов, изменить структуру и свойства выбранных из известных гликозидов путем биотрансформации; исследовать взаимосвязь между структурой указанных веществ и их вкусовыми характеристиками.

В разделе «*Экспериментальная часть*», состоящем из четырёх глав, приведены экспериментальные данные полученные автором по ферментативной модификации гликозидов стевии (Реbаудинозид D, РеbM, РеbА); данные по трансферрилозилрованию одного из основных сладких гликозидов стевии Реbаудинозид А, выделению и очистке полученного феррилозил-РеbА; описаны ферменты, с помощью которых проводилась биотрансформация (микробная ЦТтаза и β-феррилофуранозидаза), описан способ культивирования, который использовался автором для получения готового фермента, показаны оптимальные условия для биотрансформации данных стевии гликозидов данными полученными ферментами. Также показана усовершенствованная схема очистки минеральных гликозидов стевии РеbD и РеbM. Также в разделе показана взаимосвязь между вкусовыми характеристиками и структурой гликозидов стевии. Проведен сенсорный



анализ полученных сахарозаменителей и сравнительная характеристика вкусового профиля.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» указано, что в работе применялись современные методы ВЭЖХ, как препаративного, так и аналитического методов исследования, микробиологические - для получения ферментов и органолептические методы для оценки вкусовых качеств полученных подсластителей, а также методы определения ферментативных активностей. Лаборатория, где проводились все исследования и применялись вышеперечисленные методы, соответствует стандарту ISO9001:2015 и ISO22000:2018.

В третьей главе «Ферментативная модификация глюкозидов стевии» На основе ферментативной модификации ЦТ-азой и ФФ-лазой разработана технологическая схема получения сладких глюкозидов стевии. Приведены экспериментальные данные, полученные автором, по биотрансформации главного компонента листа РеА с помощью ЦТ-азы и γ-ГЛ в качестве донора глюкозных единиц, а также крахмала в качестве донора глюкозных единиц. Проведено трансглюкозилирование минорных сладких компонентов листа стевии РеD и РеM с помощью ЦТ-азы. Проведена дальнейшая очистка полученных производных РеА-Г1-Г3, а РеD-Г1-Г3 и РеM, как самостоятельных сахарозаменителей, на адсорбционных смолах.

В четвёртой главе «Трансфруктозилирование РеА *β*-фруктофуранозидом» изучен процесс глубинного культивирования *Arthrobacter sp.* К-1 в лабораторном ферментере для получения ферментного препарата. Показана оптимизация условий биотрансформации РеА, выделение и очистка фруктозилированного ребаудиозида А. Получен продукт - подсластитель РеА-Fru.

Пятая, заключительная глава «Взаимосвязь между вкусовыми характеристиками и структурной глюкозидов стевии», посвящена изучению качественных показателей полученных подсластителей, их органолептической оценке. Так у человека выявлены пять вкусовых особенностей: сладкий, кислый, горький, соленый и умами. Синтетические и натуральные высококонцентрированные подсластители, проявляют сладкий вкус, который отличается от вкуса углеводных подсластителей по: -Функции концентрации/отклик или Максимальный отклик;

-Вкусовому профилю;

-Временному (темпоральному) профилю;

-Адаптационному профилю.

Посторонние привкусы выявляются главными недостатками некалорийных подсластителей. Очищенные высококонцентрированные подсластители без сочетания с другими подслащивающими веществами обычно находят в пределах 4-8% эквивалента сахаразы (ЭС).



Также в данной главе представлена разработка пищевых технологий с использованием глюкозидов стевии - как природного сахарозаменителя на примере йогурта и чая (как настольного подсластителя).  
Показан расчет экономической стоимости сахара / стевииогликозидов на 100 см<sup>3</sup> продукции.

Обширная и глубокая экспериментальная база, а также эффективные методы проведения исследований, способствовавшие достижению поставленных целей и задач в полной мере, дает представление о целостной и завершенной научно-исследовательской работе, выводе и рекомендации которой обоснованы.

Содержание автореферата соответствует материалу, изложенному в диссертации.

По результатам исследования опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 3 публикации в сборниках материалов международных конференций; 4 патента (США).

**Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**  
Технология, разработанная Чхан К.В., может быть рекомендована для использования на предприятиях, выпускающих заменители сахара, а также в различных областях пищевой промышленности, в технологических процессах напитков, соков, кофе, чая, в пищевых продуктах, в кондитерском производстве, для жевательной резинки, соусов, кетчупа, зубной пасты и т.д.  
Наряду с общей положительной оценкой работы, к ней имеется несколько замечаний:

1. Биохимические методы определения, описанные в работе, достаточно устаревшие. Создается впечатление, что на фоне описанных современных ВЭЖХ методов, автор не полностью изучил вопрос современных методов определения ферментативных активностей и углеводного профиля.  
2. Исследовал ли автор активность ферментов, полученных на основе микроорганизмов *Bacillus stearothermophilus St-88* и *Arthrobacter sp.* (К-1) FERM BR-03192?

3. Для получения данных подсластителей в технологии трансглюкозилирования используются ферменты, обладающие достаточно высокой термостабильностью. Насколько полученные Вами ферментные препараты термостабильны? Ведь в технологии получения подсластителей это достаточно важно с экономической точки зрения.

4. Хотелось бы уточнить, проводились ли исследования по определению остаточной ферментативной активности после инактивации фермента, ведь у применяемых ферментов достаточно высокий температурный оптимум?

5. По тексту диссертационной работы встречаются отдельные неточности, опечатки.  
Отмеченные замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической ценности диссертационной работы.

