

## Отзыв

### официального оппонента

доктора технических наук, профессора Кульневой Надежды Григорьевны на диссертационную работу **Чхан Кристины Викторовны** «Улучшение вкусовых характеристик гликозидов стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) методом ферментативной биотрансформации», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.18.07 «Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ»

Диссертационная работа Чхан Кристины Викторовны посвящена улучшению вкусовых характеристик гликозидов стевии методом ферментативной биотрансформации с помощью ферментов ЦГТазы и  $\beta$ -ФФазы, а также выделению и изучению сладких минорных гликозидов стевии, обладающих улучшенными сенсорными характеристиками.

### Актуальность проблемы

Рассматриваемая в работе проблематика представляется весьма актуальной. Несмотря на быстрое развитие в сфере биотехнологии пищевых продуктов, проблема ограниченности применения искусственных подсластителей ввиду их негативного воздействия на организм человека при чрезмерном потреблении по-прежнему не устранена. В этой связи возрастает значение природных низкокалорийных сахарозаменителей, обладающих рядом вкусовых и качественных характеристик, которые позволяют существенно сократить количество быстрых углеводов в продуктах питания. На этом фоне научный интерес все больше вызывает изучение биотрансформации гликозидов стевии как одного из наиболее перспективных источников получения натуральных высокоинтенсивных подсластителей. Другое направление - выделение и изучение сладких гликозидов стевии, аккумулирующихся в следовых количествах, с целью создания оптимизированных смесей, обладающих улучшенными сенсорными свойствами и потенциально имеющих существенный коммерческий потенциал.

Ферментативно гликозилированные продукты могут быть использованы для создания подсластителей для конкретной отрасли пищевой

промышленности. Кроме того, высокая чистота отдельных гликозилированных производных благодаря их вкусовому профилю может увеличить спрос и открыть новые области применения для подсластителей из стевии.

Достоинством диссертационной работы является ее обширная и глубокая экспериментальная база, а также эффективные методы, использованные в проведении исследований и способствовавшие достижению поставленных целей и задач. В работе применялись методы ВЭЖХ в качестве препаративного и аналитического методов исследования, физико-химические методы очистки, микробиологические для получения ферментов и органолептические методы для оценки полученных подсластителей. Экспериментальная лаборатория отвечает мировым стандартам (ISO9001:2015 и ISO22000:2018).

#### **Научная новизна работы**

Научная новизна диссертационной работы Чхан К.В. не вызывает сомнений. Автором впервые проведены целенаправленные и сравнительные исследования по трансгликозелированию гликозидов стевии РебА, РебD и РебМ с помощью ферментов цикломальтодекстрин глюканотрансферазы (ЦГТаза) и  $\beta$ -фруктофуранозидазы (ФФаза). Выявлены рациональные условия трансгликозелирования.

Предложены методы выделения и очистки моно-, ди- и тригликозилированных производных РебА, РебD и РебМ, получен и очищен фруктозил-РебА и охарактеризованы их вкусовые качества.

Выявлены особенности очистки минорных гликозидов стевии РебD и РебМ и изучены их сенсорные характеристики.

Установлена взаимосвязь между структурными особенностями молекул гликозидов и качеством вкуса.

#### **Научно-практическая значимость**

Диссертационная работа имеет высокую научно-практическую значимость. Ферментативное трансгликозелирование эффективно для структурной модификации биологически активных соединений, включая высокоинтенсивные подсластители. Трансгликозелирование натуральных

подсластителей приводит к значительному улучшению вкусовых характеристик, например, удаление горького привкуса, регулирование начального ощущения сладости, высокая растворимость и т.д. В некоторых случаях такие модификации могут быть использованы для создания уникальных и эффективных физиологически функциональных пищевых продуктов.

Именно изучению влияния ферментативного трансгликозилирования гликозидов стевии на их вкусовые характеристики посвящена настоящая работа. Для этого были проделаны исследования по идентификации, очистке и характеристике новых гликозидов стевии, присутствующих в следовых количествах, но обладающих более приемлемыми вкусовыми качествами.

Также стоит отметить, что автором помимо лабораторных испытаний, были успешно проведены производственные пилотные испытания по биотрансформации и очистке производных сладких гликозидов растения *Stevia rebaudiana* Bertoni с целью использования в качестве природных сахарозаменителей в напитках и пищевых продуктах, в условиях пилотной установки биотехнологического завода PureCircle Sdn. Bhd. (Малайзия). Несомненно, научно-практическую значимость подтверждают 4 опубликованных патента (США).

Задачи исследования чётко сформулированы и полностью соответствуют поставленной цели работы.

Хорошо и обширно представлен обзор литературы, автором проведен значительный анализ и обобщение литературных данных по разрабатываемым вопросам, преимущественно по зарубежным источникам.

Достоинством диссертационной работы является ее обширная экспериментальная часть, представленная в четырёх главах. В работе идентифицированы минорные сладкие гликозиды стевии ребаудиозид D и ребаудиозид M и разработан эффективный метод получения высокочистых РеbD и РеbM, изучены их сенсорные характеристики. Модифицированы в присутствии циклодекстринов и крахмала в качестве доноров и исследованы особенности трансгликозилирования ребаудиозидов A, ребаудиозидов D и

ребаудиозида М с помощью ЦТазы термофильного штамма *Geobacillus stearothermophilus* St-88 и  $\beta$ -фруктофуранозидазы и установлено, что степень и эффективность трансгликозилирования находятся в строгой зависимости от концентрации субстрата и фермента, pH, температуры и длительности реакции; показана возможность получения гликозилированных гликозидов стевии с различной длиной боковых цепочек.

Разработаны методы очистки моно-, ди- и тригликозилированных производных ребаудиозида А, ребаудиозида D и ребаудиозида М на основе их сродства к макропористому носителю и охарактеризованы их вкусовые качества.

Разработаны эффективные хроматографические и физические методы для получения очищенных препаратов гликозидов в лабораторных и пилотных условиях.

Выявлена связь между строением гликозидов и вкусовыми характеристиками модифицированных и немодифицированных гликозидов стевии, что может служить основой для создания новых оптимизированных смесей гликозидов стевии с улучшенным вкусовым, адаптационным и терпальным профилями.

Диссертантом проведены исследования, имеющую значительную научную и практическую значимость, показана взаимосвязь между содержанием типа и количества углеводов и положением их связи с основной молекулой, тем самым зависимость вкусовых характеристик соединений от их строения. Выявленные закономерности трансгликозилирования различных гликозидов с помощью ЦТаз и  $\beta$ -фруктофуранозидаз могут быть применены для присоединения других типов углеводных остатков под действием таких ферментов, как  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -глюкозидаза и др. Полученный автором задел исследований в некоторой степени может служить в качестве основы для практических работ по трансгликозилированию различных соединений методом биокатализа.

Общий объем диссертации составляет 145 страниц, включает 19 таблиц и 60 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части из 4 глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 178 ссылок, и 4 приложений. Список литературы содержит 178 источников, в том числе 160 зарубежных авторов.

Результаты и основные положения диссертационного исследования были представлены и получили положительную оценку на международных российских научных конференциях. В частности, основные положения работ представлены на конкурсах и конференциях: «Regional conference on culture collection «Culture Collections – The Challenge and the Future» (Куала Лумпур, 201 г.); XIII Международном биотехнологическом Форуме-Выставке «РосБиоТех 2019» (Москва, 2019 г.). Результаты исследований отмечены дипломом и золотой медалью в рамках конкурса молодых учёных по улучшению вкусовых характеристик гликозидов стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) методом ферментативной биотрансформации (Москва, 2019 г.).

По результатам исследований опубликованы 12 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ; 1 печатная статья (Малайзия); 2 печатные статьи других изданий (Москва), 2 печатные статьи в сборниках конференций с докладом (Москва); четыре опубликованных патента (США).

#### **Соответствие автореферата основным положениям**

Автореферат полностью отражает основные положения и содержание диссертационной работы.

#### **По диссертационной работе имеются некоторые замечания:**

1. На с. 4 автореферата и с.7 диссертации неудачно сформулирована научная новизна работы: «Методы выделения и очистки моно-, ди- и тригликозидированных производных РебА, РебD и РебМ и сравнительно охарактеризованы их вкусовые качества.»
2. С.56 – «Выделение и очистку индивидуальных производных осуществляли на 10-ти колонках с смолой Diaion HP-20, соединенных между собой параллельно.» По описанию опыта процесс идет последовательно.

То же с. 64 – «Выделение и очистка индивидуальных производных РеВД.

Процесс осуществляли аналогично вышеописанному для РеВА.»

3. С.56 - Не понятно, почему наибольший выход моно- и дигликозильированных производных из четвертой и седьмой колонок (рис.23)?

4. С.62 – «Осадок 60%-ного РеВД отделяли фильтрованием и промывали 15-тью объемами деионизированной воды при 65-68°C в течение 1 ч.» Для чего в таком случае на рис. 26 включен процесс центрифугирования?

5. С.25 – «Воду добавляют в количестве 0,05 частей от веса сухих листьев.» - при таком соотношении экстрагента и материала процесс экстракции невозможен.

6. С.103 – Неточности при обосновании экономической эффективности использования сладких гликозидов стевии в качестве сахарозаменителей: «Средняя урожайность сахарного тростника с гектара в год составляет около 100 млн. Тонн. Средняя урожайность сахара с гектара в год составляет около 100 млн. тонн (урожай 10%).»

«При средней сладости 250 по сравнению с сахарозой 1 г стевии способна заменить 57 тонн сахара.»

7. Имеются несогласованные выражения:

С.46 – «...проводили реакцию трансгликозильирования в присутствии g-ЦД в соотношении 1:1 (в/в) осуществляли следующим образом.»

С. 5 автореферата – «Способ выделения и очистки из экстракта лист стевии минорных гликозидов РеВД и РеВМ, обладающие лучшими вкусовыми характеристиками, для использования их как самостоятельных сахарозаменителей так и в оптимизированных смесях.»

8. На с. 18 повторение текста: «(а) изомеризация С-16 олефина с образованием С-15 изомера,..., (г) изомеризация С-16 олефина с образованием С-15 изомера.»

9. На с. 80 Рисунок 42 (MSD анализ РеВА (А) и фруктозил-РеВА (В)) плохо читаем.

10. Имеются опечатки на с.6,7,8,18,27,35,53,61,79,95,103,107,111.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не влияют



на общую положительную оценку диссертационной работы.

### Заключение

Выполненная диссертационная работа Чхан Кристины Викторовны на тему «Улучшение вкусовых характеристик стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) методом ферментативной биотрансформации» является завершённой научно-квалификационной работой, имеющей широкий потенциал практического применения её результатов и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положение о присуждении учёных степеней», утвержденному Постановлением правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата технических наук по специальности 05.18.07 - «Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ».

Официальный оппонент:  
профессор кафедры технологии  
бродильных и сахаристых производств  
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный  
университет инженерных технологий»,  
доктор технических наук, доцент  
специальность 05.18.05 Технология сахара  
и сахаристых продуктов, чая, табака и  
субтропических культур

 Кульнева  
Надежда Григорьевна

«12» сентября 2019 г.  
Адрес: 394036, Россия, г. Воронеж,  
проспект Революции, д.19  
Телефон: +7 (473)255-42-67  
E-mail: [post@vsuet.ru](mailto:post@vsuet.ru)

