

**Отзыв официального оппонента
доктора технических наук Лукина Николая Дмитриевича
на диссертационную работу Чхан Кристины Викторовны
на тему «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».**

Актуальность темы исследований

На современном этапе развития биотехнологии пищевых продуктов проблема ограниченности применения искусственных подсластителей вследствие их воздействия на здоровье человека при чрезмерном потреблении остается нерешенной, в связи с этим возрастает значение природных низкокалорийных сахарозаменителей растительного происхождения, которые безвредны для человеческого организма, обладающих рядом вкусовых и качественных характеристик и могут быть использованы в пищевой промышленности и медицине.

В настоящее время известны множество растений с содержанием соединений по сладости, превосходящие сахар в сотни и тысячи раз. Однако, коммерческое использование их как сырья для производства сахарозаменителей ограничено либо трудностью сбора плодов и нетехнологичностью переработки, либо содержанием токсичных соединений.

В этой связи все большей популярностью пользуется *Stevia rebaudiana Bertoni* (стевия), которая аккумулирует ряд сладких гликозидов, сладость которых от 30 до 450 раз превышает сладость сахарозы. Однако при использовании они проявляют остаточную горечь и послевкусие, которые влияют на вкусовые качества продуктов и ограничивают их применение. Актуальность исследований в области биотрансформации

гликозидов стевии как одного из наиболее эффективных источников получения натуральных высокоинтенсивных подсластителей, не вызывает сомнений. Диссертационная работа Чхан Кристины Викторовны посвящена улучшению вкусовых характеристик стевии методом ферментативной биотрансформации с помощью ферментов ЦГТазы и β -ФФазы, а также выделению и изучению сладких минорных гликозидов стевии, аккумулирующихся в следовых количествах, с целью создания оптимизированных смесей, обладающих улучшенными сенсорными свойствами и потенциально имеющих существенный коммерческий потенциал.

Ферментативно гликозилированные продукты также могут быть использованы для создания подсластителей, специально предназначенных для конкретной отрасли пищевой промышленности с конкретным использованием. Кроме того, высокая чистота отдельных гликозилированных производных благодаря их вкусовому профилю может увеличить спрос и открыть новые области применения для подсластителей из стевии.

Диссертационная работы выполнена с использованием эффективных методов проведения исследований, способствовавших достижению поставленных целей и задач в полной мере. В работе применялись методы ВЭЖХ, как препаративного так и аналитического методов исследования, физико-химические методы очистки, микробиологические для получения ферментов и органолептические методы для оценки полученных подсластителей. Соответствующая лаборатория отвечает лучшим мировым стандартам (ISO9001:2015 и ISO22000:2018).

Научная новизна исследований

Научная новизна работы состоит в том, что впервые проведены целенаправленные и сравнительные исследования по

трансгликозилированию гликозидов стевии РебА, РебD и РебМ с помощью ферментов цикломальтодекстрин глюканотрансферазы (ЦГТаза) и β -фруктофуранозидазы (ФФазы), оптимизированы условия процесса и охарактеризованы вкусовые качества получаемых продуктов.

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

Установлена взаимосвязь между структурными особенностями молекул гликозидов и качеством вкуса.

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

Новизна исследований подтверждена четырьмя патентами США.

Научно-практическую значимость работы

Безусловным преимуществом диссертационной работы Чхан Кристины Викторовны является ее обширная и глубокая экспериментальная база, а также эффективные методы проведения исследований, способствовавшие максимальному достижению поставленных целей и задач.

Диссертантом проведены имеющие высокую практическую значимость исследования, разработаны методы трансгликозилирования сладких гликозидов стевии РебА, РебD и РебМ различными трансферазами с применением в качестве доноров глюкозных единиц крахмала и/или γ -циклодекстрина. Показана взаимосвязь между содержанием типа и количества углеводов и положением их связи с основной молекулой, а также со вкусовыми характеристиками соединений.

Диссертантом успешно проведены помимо лабораторных и **производственные пилотные испытания** по биотрансформации и очистке производных сладких гликозидов растения *Stevia rebaudiana* Bertoni с целью получения продуктов для использования их в качестве

природных сахарозаменителей в напитках и пищевых продуктах, в условиях пилотной установки биотехнологического завода PureCircle Sdn. Bhd. (Малайзия).

Ферментативное трансгликозилирование эффективно для структурной модификации биологически активных соединений, включая высокоинтенсивные подсластители. В качестве модификации соединений можно изменять структуру, характеристики и биологическую доступность, создавать новые функции и открыть новые области и возможности их применения. Трансгликозилирование натуральных подсластителей приводит к значительному улучшению вкусовых признаков, 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.

В этом отношении, очень важно выявить взаимосвязь между структурными особенностями и вкусовыми качествами этих веществ с целью создания целенаправленно модифицированных гликозидов с заранее прогнозируемыми сенсорными характеристиками.

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.

Легкий и доступный способ получения и разделения гликозилированных производных с различной длиной боковых цепочек позволяет организовать их производство с очень высокой эффективностью и воспроизводимостью, что является очень важным признаком для промышленности.

Разработанный метод трансглюкозилирования благодаря своей эффективности может стать основой для промышленного применения с целью модификации минорных гликозидов, получения и очистки отдельных глюкозилированных производных.

Общий объем диссертации 145 страниц, включая 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.

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

Результаты и основные положения диссертационного исследования были представлены и получили положительную оценку на международных и российских научных конференциях. В частности, основные положения работы представлены на следующих конкурсах и конференциях: «Regional conference on culture collection «Culture Collections – The Challenge and the Future» (Куала Лумпур, 2015 г.); XIII Международный биотехнологический Форум-Выставка «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.).

Соответствие автореферата основным положениям

Автореферат дает представление о целостной и завершённой научно-

исследовательской работе и полностью отражает основные положения и содержание диссертационной работы.

По диссертационной работе имеются некоторые замечания:

1. В главе «Материалы и методы» не указан вид крахмала и не приведены методы определения степени трансгликозилирования гликозидов стевии с применением в качестве доноров крахмала и γ -циклодекстрина
2. Не были определены характеристики продуктов начальной стадии трансгликозилирования крахмала и γ -циклодекстрина
3. Было бы желательно дать сравнительную оценку рекомендуемым ЦГТазе и фруктофуранозидазе.
4. Автором допущена неточность в главе 4 диссертации, где говорится о новом производном Фруктозил-РебА, однако указан Фруктозил - стевииозид .
5. В таблице 15 на стр. 91, где показана интенсивность сладости различных подсластителей в зависимости от контрольной концентрации сахарозы, следовало бы показать сладость продуктов при низких концентрациях сахарозы.
6. На стр. 103-104 в расчете экономической эффективности требуется уточнить стоимость стевииогликозидов с учетом затрат на трансгликозилирование.

Однако указанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Чхан Кристины Викторовны на тему: «Улучшение вкусовых характеристик стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) методом ферментативной биотрансформации» является завершенной научно-квалифицированной работой, имеющей широкий потенциал

