

В І Д Г У К
офіційного опонента на дисертаційну роботу
ВОВКОГОН АЛІНИ ГРИГОРІВНИ
«Теоретичне та практичне обґрунтування розробки біотехнологій
іммобілізації клітин заквасок для кисломолочних напоїв» на здобуття
наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю
03.00.20 – біотехнологія

I. Актуальність теми

Харчування людини сьогодні розглядається не тільки під кутом зору його збалансованості, але й адекватності, що передбачає обов'язкове надходження з їжею живих бактерій-симбіонтів. Відомо, що кишкова мікрофлора становить 95 % від загальної кількості клітин тіла людини і може мати як позитивний, так і негативний вплив на організм. Її склад та структура залежать від багатьох факторів – індивідуальних особливостей, стану здоров'я, гігієни, традицій та типу харчування. Під дією стресових впливів, неконтрольованого масового вживання антибіотиків та хіміотерапевтичних препаратів, техногенного забруднення сировини та довкілля, а також при неповноцінному харчуванні може виникнути розбалансування нормальної мікрофлори і, як наслідок, – зниження захисних властивостей організму, зміна його метаболічної активності і масове виникнення дисбіозів. Усе це вимагає радикальних оздоровчих засобів, і найпростішим із них та найефективнішим може бути розроблення та впровадження у виробництво продуктів, які забезпечують надходження максимальної кількості життєздатних молочнокислих та інших пробіотичних мікроорганізмів. Ілюстрацією цього може бути знаменитий вислів Гіппократа “Нехай їжа буде твоїми ліками”. Авторка свою роботу присвятила підвищенню стійкості та відповідно виживання молочнокислих, а також біфідобактерій та ентерококів, які проявляють пробіотичну дію: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* та *Enterococcus faecium* у складі загальноновживаного кисломолочного напою йогурт та надзвичайно цінного продукту з геродієтичними властивостями Стрептосан.

Дисертантка використала оригінальний і піонерський у нашій країні підхід для підвищення виживання і забезпечення стабільності ферментації молочнокислих бактерій – їх іммобілізацію на носіях білкової і вуглеводневої природи.

Іммобілізація мікробних клітин вперше була застосована 150 років тому. Однак бурхливий розвиток досліджень і застосування цього методу у біотехнології припадає на 70-ті роки минулого століття. У молочній промисловості іммобілізацію молочнокислих бактерій використовують, зокрема, для захисту від бактеріофагів, як носій добре зарекомендував себе гель альгінату кальцію. Автори вказують, що при цьому знижується активність протеїназ, підвищується виживання мікробних клітин (Steenon

L.R. et al., 1986). Є повідомлення, які засвідчують ефективність застосування кусочків цукрової тростини для іммобілізації кефірних грибків (Ker-Sin Ng et al., 2019). Для іммобілізації клітин також можна використовувати часточки яблук, апельсинів, папайї, інших фруктів (Kourkoutas Y. et al., 2005), але через меншу пористість, вони менш придатні. Можна використовувати казеїнові міцели (Dimitrellos D et al., 2009, 2010), а також целюлозу (Kourkoutas Y. et al., 2002) як носії для іммобілізації молочнокислих бактерій.

З-посеред трьох методів іммобілізації мікробних клітин – на твердому носії, мембранах та включення у просторову структуру, авторка використала останній. Саме іммобілізація мікробних клітин у структуру тривимірних гелів дозволяє значно підвищити густину клітин і продуктивність біотехнологічних процесів. Іммобілізовані клітини мають більший захист від зовнішніх чинників, наприклад, зміни рН. Однак, цей метод має ряд недоліків, зокрема, обмежена дифузія субстрату, що викликає пригнічення поділу клітин. Для попередження цього дисертантка запропонувала модифікацію гелевих матриць, авторкою розроблено способи такої модифікації та її технологію. У роботі детально досліджено нову технологію та здійснено її аналіз. За допомогою модифікації вдалось добитись підвищення ефективності в межах 21-27%. Таким чином, дисертанткою поставлено та вирішено проблему іммобілізації мікробних клітин заквашувальних препаратів для кисломолочних продуктів з метою підвищення їх стійкості до інгібуючих чинників та подовження терміну зберігання.

Як носії іммобілізації авторка використала модифіковані пектин, желатин та крохмаль, дослідила їх у порівняльному аспекті, встановивши значні переваги пектину та желатину. Заслуговують уваги скрупульозні дослідження дисертантки щодо встановлення нешкідливості, можливої токсичності та подразнюючої дії вказаних носіїв. Авторкою переконливо доказано їх повну безпечність у застосуванні для харчових цілей.

Підсумовуючи усе вищесказане, можна стверджувати, що тема дисертаційної роботи А.Г. Вовкогон є актуальною. Її метою є теоретичне та практичне обґрунтування вирішення проблеми підвищення стійкості заквасок для кисломолочних продуктів до умов зберігання та дії інгібуючих чинників у молоці шляхом біотехнології іммобілізації клітин мікроорганізмів закваски йогурту та стрептосану на модифікованих природних органічних носіях.

Завдання досліджень у дисертації обумовлені поставленою метою роботи, вони полягають у розробці технології модифікації крохмалю, пектину та желатину; дослідженні їх сорбційних властивостей та встановленні їх безпечності у харчових продуктах; розробленні схеми і технології іммобілізації закваски для йогурту та стрептосану на модифікованих носіях; визначенні доз та термінів придатності іммобілізованих заквасок та стійкість молочнокислих, біфідобактерій та ентерококів, що входять до їх складу, до дії антибіотиків, а також

виготовленні продуктів (йогурт та стрептосан) із використанням іммобілізованих заквасок та дослідженні їх властивостей. До завдань також входило дослідити економічну ефективність використання іммобілізованих заквасок.

Актуальність роботи підтверджується й тим, що вона є фрагментом теми «Розроблення біотехнологій одержання стабілізованих заквасок та ензимних препаратів для виробництва кисломолочних продуктів» (№ держреєстрації 0120U100372), що виконується в НДІ харчових технологій та технологій переробки продукції тваринництва Білоцерківського національного аграрного університету.

II. Ступінь обґрунтованості наукових положень, їх достовірність і новизна

Основні положення дисертаційної роботи Вовкогон А.Г. узгоджуються із сучасними джерелами інформації про теоретичні закономірності і практичні аспекти іммобілізації мікробних клітин з метою підвищення їх виживання і стійкості до інгібуючих чинників.

Наукове значення роботи

До найвагоміших наукових результатів, що одержані автором та винесені на захист, слід віднести такі:

уперше відпрацьовано технології модифікації пектину, желатину та крохмалю фізико-хімічними методами;

доведено нешкідливість, нетоксичність та відсутність подразнюючої дії модифікованих пектину, желатину та крохмалю;

уперше розроблено біотехнологію іммобілізації закваски для йогурту та кисломолочного продукту стрептосан на модифікованих органічних носіях; виготовлено продукти із властивостями, що відповідають вимогам нормативної документації;

уперше встановлено оптимальні дози внесення іммобілізованих заквасок у молоко корів для одержання якісних кисломолочних напоїв.

встановлено тривалість зберігання іммобілізованих заквасок для йогурту та стрептосану;

доведено стійкість іммобілізованих заквасок для йогурту та стрептосану до дії антибіотиків.

Практичне значення роботи

Розроблено технологію модифікації нативного пектину і желатину, завдяки чому сорбційні показники підвищені на 20,8 і 26,9 % порівняно з нативною формою.

Унаслідок проведення досліджень гострої токсичності модифікованих носіїв було доведено, що ці харчові добавки відносяться до малотоксичних

сполук (4 клас згідно з ГОСТ 12.1.007). DL_{50} на білих мишах та щурах є більшим 5000 мг/кг.

Встановлено, що оптимальним співвідношенням матриця (мг) : розчинник (см³) : закваска (мг) є 1000:0,2:60. За такого співвідношення зберігається найвища активність закваски. Висушування іммобілізованої закваски за такого співвідношення є найшвидшим.

Іммобілізація заквасок йогурту та стрептосану дозволяє пролонгувати час їх зберігання на 12-18 місяців. Доведено, що іммобілізовані закваски йогурту та стрептосану здатні згортати молоко із вмістом пеніциліну до 20–25 Од/см³.

На основі отриманих даних розроблено рекомендації щодо біотехнології виробництва іммобілізованих заквасок йогурту та стрептосану і їх використання за виробництва кисломолочних продуктів.

Матеріали наукової роботи можуть бути використані в курсах лекцій з дисциплін «Біотехнологія», «Біотехнологія в харчовій промисловості», «Технологія галузі» у закладах вищої освіти для підготовки фахівців за спеціальностями «Біотехнологія», «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва» та «Харчові технології».

Обґрунтованість та достовірність основних наукових положень і висновків, що сформульовані у роботі, забезпечено використанням сучасних методів досліджень і засобів вимірювань. Дисертаційна робота виконана методично правильно. Результати експериментальних досліджень опрацьовані з використанням математично-статистичних методів. Отримані результати представлені у таблицях та на рисунках достатньо проаналізовані.

Достовірність отриманих наукових результатів підтверджено виробничими випробуваннями на підприємстві ПП «ОЛВІ БЦ» с.Озірне, Білоцерківського району, Київської області.

III. Оцінка об'єму та змісту дисертації

Дисертаційна робота Вовкогон А.Г. викладена на 314 сторінках друкованого тексту. Робота містить анотації українською і англійською мовами, складається зі вступу (6 сторінок), чотирьох розділів - огляду літератури (35 сторінок), загальної методики та методів досліджень (26 сторінок). результатів власних досліджень (142 сторінки), аналізу та узагальнень результатів досліджень (30 сторінок), а також висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел (402 джерела, з них 209 латиницею) та 3 додатків (на 6 сторінках). Робота проілюстрована 13 рисунками і містить 106 таблиць.

У **Вступі** автор приводить наукове обґрунтування актуальності теми, розкриває зв'язок роботи з науковими програмами, чітко ставить мету та визначає завдання досліджень, характеризує об'єкт і предмет досліджень, вказує методи досліджень, представляє наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, визначає особистий внесок, відображає результати апробації та публікації за темою дисертаційної роботи.

Літературний огляд містить 3 підрозділи. У першому представлено сучасні дані літератури щодо іммобілізації клітин та їх використання. У другому – описано технологію кисломолочних продуктів. У третьому – охарактеризовано харчові добавки (пектин, желатин, крохмаль) як носії для іммобілізації клітин. Таким чином, у першому розділі проведено аналіз сучасного стану усіх завдань, які поставлено у дисертаційній роботі. Зроблено загальні висновки про відсутність теоретичного вирішення проблеми іммобілізації клітин молочнокислих бактерій для виробництва молочних продуктів.

Другий розділ **Загальна методика та методи досліджень** містить два підрозділи - **Матеріали і місце проведення досліджень** та **Схеми постановки, умови проведення експериментів та методи визначення показників**, в яких подано схему досліджень, детально описано матеріали та методи досліджень з посиланнями на джерела.

Розділ 3 **Результати власних досліджень** містить 9 підрозділів. У першому підрозділі **Моделльні дослідження щодо модифікації носіїв та вивчення їх сорбційних властивостей** представлено результати досліджень сорбційних властивостей нативних форм крохмалю, желатину і пектину, представлено схему та описано технологію їх модифікації. Подано дані щодо сорбційних характеристик модифікованих носіїв, які засвідчують про переваги останніх порівняно з нативними формами.

У другому підрозділі **Вивчення нешкідливості та токсичності модифікованих носіїв** представлено і проаналізовано результати щодо токсикологічних характеристик модифікованих форм желатину, пектину і крохмалю – нешкідливості, гострої токсичності та подразнюючої (шкідливої) дії. Досліди щодо нешкідливості проведено на білих мишах, вони переконливо засвідчують, що внутрішньошлункові введення підвищених доз вказаних речовин не викликають змін у поведінці тварин, не спричиняють розладів у роботі травного тракту та порушень білкового та вуглеводного обмінів. Не зареєстровано летальних випадків та змін в органах під час патолого-анатомічних досліджень за введення модифікованих носіїв. Показники гострої токсичності модифікованого желатину, пектину та крохмалю вивчали на білих щурах та білих мишах, результати вказують на те, що ці харчові добавки є малотоксичними, їх середня смертельна концентрація становить понад 5000-6000 мг/кг. Доведено також, що модифіковані носії не викликають подразнюючої дії за умов їх нанесення на слизову оболонку очей кролів, при цьому показники білкового і вуглеводного обміну в сироватці крові кролів відповідали фізіологічним.

Підрозділ третій **Дослідження стійкості нативних заквасок для кисломолочних продуктів до антибіотиків** містить результати щодо доз пеніциліну і стрептоміцину, які викликають інгібування мікробіальних клітин заквашувальних препаратів для йогурту і стрептосану. Показано, що молочнокислі, біфідобактерії та ентерококи чутливі до відносно невеликих доз антибіотиків.

Підрозділ 4 **Конструювання та перевірка іммобілізованих заквасок для кисломолочних напоїв** представляє схему іммобілізації заквашувальних препаратів, в ньому подані і проаналізовані результати щодо співвідношень між носієм, розчинником та закваскою, а також результати встановлених доз цих препаратів, термінів зберігання. Результати засвідчують про переваги над препаратами без іммобілізації.

Велика увага у роботі зосереджена на дослідженнях стійкості іммобілізованих клітин заквашувальних препаратів до антибіотиків, результати яких наведено у підрозділі 5 **Вивчення стійкості іммобілізованих заквасок до інгібуючих чинників у молоці**. Дані щодо титрованої кислотності сквашеного молока з високими дозами пеніциліну і стрептоміцину засвідчують про значно більшу чутливість клітин нативних препаратів порівняно з іммобілізованими.

Наступні три підрозділи присвячені дослідженням властивостей йогурту і стрепосану, які виготовлені із використанням іммобілізованих заквашувальних препаратів, а саме дослідженням **в'язкості і відновлення структури кисломолочних напоїв; мікробіологічних показників та амінокислотного складу кисломолочних продуктів, органолептичних та фізико-хімічних показників йогурту із наповнювачем, виготовленого за використання іммобілізованої закваски**. Показано, що показники йогурту і стрепосану відповідають вимогам нормативної документації, а кількість життєздатних КУО молочнокислих, біфідобактерій та ентерококів у продуктах, виготовлених із застосуванням іммобілізованих заквашувальних препаратів є вищою, порівняно з такими із застосуванням нативних препаратів.

За **економічними показниками**, результати яких подано у дев'ятому підрозділі, виробництво кисломолочних напоїв із використанням іммобілізованих мікробіальних препаратів є доцільним, собівартість продуктів знижується на 0,2%.

Загальні висновки щодо дисертаційної роботи повністю висвітлюють одержані наукові результати з їх кількісними показниками, а **пропозиції виробництву** включають основні рекомендації щодо використання розроблених іммобілізованих препаратів.

У **додатках** подано акти впровадження розроблених технологій у виробництво.

IV. Оцінка публікацій, автореферату та оформлення дисертації

Повнота викладу наукових положень, висновків та рекомендацій дисертації в опублікованих працях.

Результати дисертації знайшли повне відображення у 29 наукових працях автора, у тому числі: 23 статті у наукових фахових виданнях (з них 1 стаття у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз), 2 статті – у міжнародних виданнях, 1 тези доповіді на науковій

конференції, 3 – рекомендаціях. Обсяг, кількість і джерела публікацій відповідають діючим вимогам до докторських дисертацій.

Відповідність змісту автореферату основним положенням дисертації

Автореферат повністю відповідає структурі та змісту дисертації, а наукові положення і висновки зроблені дисертантом ідентичні з наведеними у дисертаційній роботі.

Автореферат оформлений відповідно до чинних вимог. Таблиці (4) і рисунки (6) доповнюють текстовий матеріал статистично опрацьованими результатами експериментальних досліджень. Зустрічаються окремі граматичні помилки, описки та помилки у знаках пунктуації.

Аналіз мови, стилю та оформлення дисертації

Стиль викладення матеріалів дисертаційної роботи науковий, логічний.

Зустрічаються граматичні помилки (стор. 14, 22, 24, 27, 35, 39, 46, 51, 52, 54, 85, 149) та помилки в знаках пунктуації. Зустрічаються помилки в латинських назвах: *Mucabacterium* замість *Mycobacterium*; *thermoproteoliticum* замість *thermoproteolyticum*; *Aurerobacidium pullulan* замість *Aureobasidium pullans* (стор. 24-25); *helvetscus* замість *helveticus* (стор. 35). Виявлено також помилки в термінах, наприклад, лактоферицину замість лактоферину (стор. 48); фіто-гідрозидного Фосфору замість фіто-гідролізного Фосфору (стор. 39). Зустрічаються некоректні вислови: «використано інші штами», коли йде мова про види (стор. 47); *Str. lactis* і *Str. cremoris* замість *Lac. lactis* і *Lac. cremoris* (стор.47); *Str. diacetilactis* *Lac. diacetilactis* (стор.48) за новою номенклатурою; фруктозу віднесено до «альдозного» цукру (стор. 89), насправді, це – кетоза; «статистичне підвищення» (стор.110), «статистичний вплив» (стор 121, 122), «статистична різниця» (стор. 118,119), де очевидно мова йде про статистично вірогідне підвищення, вплив чи різницю. Для характеристики смаку кисломолочних продуктів автор використовує терміни «неприродний», «неспецифічний», «нерегламентований», де бажано вживати терміни, передбачені ДСТУ4344:2004 «сторонні присмаки», або «смак чітко сформований» бажано – чистий, кисломолочний.

Бажано було б об'єднати деякі таблиці, де подано порівняння нативних і іммобілізованих носіїв (наприклад, табл. 3.7 і 3.8, стор. 97, 98 та табл. 3.9 і 3.10, стор. 99, 100), що спростило б їх аналіз.

Деякі таблиці не мають відповідних позначень (табл. 3.2, стор. 91).

V. Зауваження, питання та побажання

1. Не можу погодитись з автором, що з ацетоїну утворюється діацетил (стор. 48), оскільки молочнокислі бактерії продукують редуктази – ензими, які, навпаки, відновлюють діацетил до ацетоїну. Для забезпечення аромату необхідно зберегти синтезований діацетил за допомогою підбору штамів з низькими редукуючими властивостями, а

також забезпечити умови для підтримання високого окисно-відновного потенціалу середовища (аерація) та низьких плюсових температур зберігання

2. У ДСТУ 3662-97 «Молоко та молочні продукти. Вимоги при закупівлі» вказано про допустимі кількості антибіотиків у молоці 0,01 Од/г. У кисломолочних продуктах згідно МБВ № 5061 допускається вміст пеніциліну 0,01 Од/г, стрептоміцину – 0,5 Од/г. Авторка у дисертаційній роботі використовує дози від 0,5 до 65 Од/см³. Чим зумовлене використання у роботі таких високих доз антибіотиків?
3. У роботі не вказано, яку закваску використовували: висушену, бактеріальний концентрат, чи безпосереднього внесення. Який виробник закваски? Яка кількість клітин в одиниці маси чи об'єму? Яка доза інокуляції передбачена інструкцією закваски?
4. Досліджуючи терміни зберігання нативних та іммобілізованих заквашувальних препаратів, автор не вказує, як та в яких умовах здійснювали їх пакування.
5. Не вказано у роботі, які температурні режими пастеризації молочної суміші використовували для виробництва йогурту, а також, чи нормалізували молочну суміш за сухими речовинами, якщо так, то яку сировину використовували для цього. Не вказано, чи здійснювали гомогенізацію молочної суміші. Не вказано також, чи показники молока для виробництва кисломолочних продуктів відповідали усім вимогам діючого Стандарту.
6. Аналізуючи процес ферментування, авторка приводить лише показники титрованої кислотності, тоді як сьогодні більше використовується поряд з титрованою кислотністю значення рН. Недоліком є й те, що не аналізуються кількісні параметри росту окремо молочнокислих, біфідобактерій та ентерококів під час ферментації. Недоцільно також було збільшувати дози антибіотиків, коли наставало повне інгібування мікроорганізмів заквашувальних препаратів.
7. Згідно Технологічних інструкцій тривалість ферментації молочної суміші при виробництві йогурту становить 3-4 години, адже йогуртові культури є активними кислотоутворювачами. Чому в роботі визначено інші часові параметри ферментації – 8 годин. Технологічною інструкцією передбачені також дещо вищі режими процесу ферментації (42°C) при виробництві йогурту, ніж використано у роботі, чим це зумовлено?
8. Бажано було б у підрозділі, де подано мікробіологічні показники кисломолочних продуктів подати дані не тільки про КУО молочнокислих бактерій, але також біфідобактерій та ентерококів. Адже саме вони формують пробіотичні властивості продуктів.
9. Замість терміну «сенсорні» показники (часто вживані автором, зокрема, на стор.178, 179, 181, 183, 187, 188), бажано, використовувати «органолептичні». Сенсорний аналіз – це оцінка якості, що проведена

експертами, у яких попередньо перевірили органи відчуття, що гарантують точність і відтворення результатів. Сенсорна оцінка є об'єктивною, її результати можуть бути об'єктивно відтвореною і статистично опрацьованою, натомість йдеться про органолептичну оцінку.

10. Не вказано у роботі, який амінокислотний склад визначали у кисломолочних продуктах, важливо було б подати спосіб виділення амінокислот. Цікаво, чим зумовлена тенденція до підвищеного вмісту окремих амінокислот у дослідних зразках йогурту і стрептосану.

Вказані зауваження не знижують загальної високої оцінки дисертаційної роботи.

V. Висновки опонента

Дисертаційна робота «Теоретичне та практичне обґрунтування розробки біотехнологій імобілізації клітин заквасок для кисломолочних напоїв» Вовкогон Аліни Григорівни є завершеною науковою працею. Дослідження виконані на відповідному науково-методичному рівні і за актуальністю теми, обсягом проведених робіт, науковою новизною одержаних результатів, їх обґрунтованістю, оформленням матеріалів, апробацією та висвітленням результатів у фахових виданнях дисертаційна робота відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старших наукових співробітників» затверджених постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 р. до докторських дисертацій.

Автореферат відповідає змісту та структурі дисертації. Назва роботи відповідає змісту, а сама робота відповідає паспорту спеціальності 03.00.20 – біотехнологія. Проведений аналіз дисертаційної роботи дає підстави вважати, що Вовкогон Аліна Григорівна є зрілим науковцем, здатним аналізувати сучасні наукові досягнення, ставити і розв'язувати наукові проблеми та заслуговує присудження наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Завідувач кафедри технології молока
і молочних продуктів
Львівського національного університету
ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С.З. Гжицького,
д.с.-г.н., професор

ВІРНО
НАЧАЛЬНИК ВІДДІЛУ КАДРІВ
ЛЬВІВСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ
ІМЕНІ С.З. ГЖИЦЬКОГО

А. Ковтух



О.Й. Цісарик

О.Й. Цісарик