

В диссертационный совет Д 24.2.315.05
на базе ФГБОУ ВО «Кемеровский
государственный университет»

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Ежковой Галины
Олеговны на диссертационную работу Ворошилина Романа
Алексеевича на тему: «Биотехнологии, состав и свойства
гидролизатов коллагена», представленную на соискание ученой
степени доктора биологических наук по специальности 4.3.5 –
Биотехнология продуктов питания и биологически активных
веществ

В результате ознакомления с диссертационной работой,
авторефератом, опубликованными работами по теме диссертации, мною
отмечается:

Актуальность темы выполненных исследований

Исследование Ворошилина Р.А. посвящено разработке эффективной
биотехнологии получения гидролизатов коллагена и оценки их свойств, что
является актуальным направлением в условиях растущего спроса на
натуральные и функциональные ингредиенты в пищевой и
биомедицинской промышленности. В работе учитываются мировые
тенденции развития биоэкономики, включая рациональное использование
вторичных ресурсов животного происхождения. Работа отвечает задачам
импортозамещения и технологического суверенитета в России.

Особую значимость тема приобретает в свете современных
достижений в области биотехнологии. Коллаген и его гидролизаты
являются не только структурными белками, но и источником коротких
пептидов, оказывающих влияние на экспрессию генов, сигнальные пути
клеток, процессы регенерации и иммунный ответ. Таким образом,

биотехнологическая переработка отходов животного происхождения в биологически активные соединения расширяет научные и прикладные границы взаимодействия между пищевыми системами и биомедициной.

Результаты исследования способствуют дальнейшему развитию фундаментальных аспектов белковой инженерии, эффективному изучению молекулярных механизмов биологического действия пептидов и внедрению системного подхода: «структура, функция, биоактивность». Тем самым, работа Ворошилина Р.А. соответствует приоритетным направлениям научно-технологического развития Российской Федерации и вносит весомый вклад в развитие междисциплинарных исследований в области биотехнологий.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения и рекомендации, приведенные в диссертационной работе, основаны на ретроспективном анализе литературного материала и результатов собственных экспериментальных исследований. Выводы, сформулированные в диссертации Ворошилина Р.А. научно-обоснованы. В этой связи обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений.

Достоверность и научная новизна исследований

Достоверность подтверждена использованием современной аналитической аппаратуры, применением валидированных методов анализа, статистической обработкой и повторяемостью экспериментов. Полученные данные обоснованы, верифицированы и апробированы в условиях промышленного производства. Результаты исследования и материалы работы были опубликованы в ряде научных изданий и представлены на специализированных конференциях.

Научная новизна состоит в разработке комплексного подхода биотехнологического подхода в получении гидролизатов коллагена с биоактивными свойствами. С использованием молекулярного докинга *in silico* автором доказана потенциальная пригодность полученных гидролизатов коллагена для применения в пищевой и биомедицинской промышленности.

Установлена эффективность ферментативного обезжиривания коллагенсодержащего сырья с применением липазы, обеспечивающей выход жира от 10 до 18 %.

Экспериментально доказано, что использование фермента пепсина (*Rhizomucor miehei*) при определённых условиях обеспечивает выход коллагена до 15,8 % из костного сырья КРС. Подтверждена эффективность гидролиза ног цыплят-бройлеров с применением пепсина (*Bacillus subtilis*), обеспечивающего выход коллагена до 16,4 %. Разработаны оптимальные условия гидролиза свиной шкурки с применением фермента поларзим (*Acremonium chrysogenum*), обеспечивающие выход коллагена до 17,3 %.

Подтверждена эффективность баромембранной ультрафильтрации: концентрация белков увеличивалась на 62, сухих веществ — на 63 % соответственно.

Проведено *in silico*-моделирование структуры пептидов, выявлены ингибиторные свойства по отношению к АПФ и ДПП-IV, отсутствие зависимости биоактивности от молекулярной массы. В исследованиях *in vivo* доказано, что гидролизаты из ног цыплят способствуют ускоренному ранозаживлению (прочность рубца увеличивалась до 64,0 %).

Соискателем установлено стимулирующее влияние гидролизатов из свиной шкурки на иммунную систему (повышение лейкоцитов до 24,4 %, моноцитов — в 1,75 раза), а также формирование прочного рубца (до 90 мкм) и восстановление структуры кожи.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основе комплексных теоретических и экспериментальных исследований в работе предложены новые подходы к производству пищевых гидролизатов коллагена с использованием биокаталитических и баромембранных технологий. Внедрение этих подходов обеспечивает получение белковых продуктов с целенаправленными биоактивными свойствами, что открывает возможности их применения в качестве функциональных ингредиентов в пищевой промышленности, а также в биомедицинских технологиях для создания продукции направленного действия.

Теоретическая значимость исследования заключается в развитии научных представлений о структурных, физико-химических и биофункциональных характеристиках пептидов коллагена, полученных из различного вторичного сырья животного происхождения. Обосновано влияние параметров биокаталитической обработки на выход целевого продукта и его молекулярные характеристики, а также подтверждена потенциальная биологическая активность полученных пептидов средствами молекулярного моделирования и *in vivo*-исследований.

Полученные результаты интегрированы в образовательный процесс ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет». Материалы исследования используются при реализации программ бакалавриата и магистратуры. Кроме того, работа легла в основу научно-исследовательской и практической подготовки аспирантов, что свидетельствует о её значении для подготовки высококвалифицированных научных кадров.

Практическая значимость подтверждена серией патентов Российской Федерации. На базе результатов диссертационной работы разработана и утверждена техническая документация на выпуск трёх типов гидролизатов коллагена (из костного сырья КРС, субпродуктов переработки птицы,

свиной шкуры), что свидетельствует о готовности технологии к внедрению в реальный сектор экономики.

Результаты работы прошли промышленную апробацию и внедрены в производственную практику на ряде предприятий: ООО НПО «Здоровое питание» (г. Кемерово), ООО «Биолит» (г. Томск), ООО «Да» (г. Владикавказ). Это подтверждает высокую прикладную значимость и востребованность разработанных решений в условиях реального производства.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертационная работа Ворошилина Р.А. представляет собой завершённое комплексное научное исследование, охватывающее все этапы – от обоснования актуальности и постановки научных задач до экспериментальной реализации и производственной апробации биотехнологии получения гидролизатов коллагена. Работа построена логично и последовательно, каждая из её частей органично вытекает из предыдущей и направлена на достижение поставленной цели.

На первом этапе автором обоснована научная и прикладная значимость темы, сформулированы цели, задачи, положения, выносимые на защиту, а также проведён обстоятельный анализ отечественной и зарубежной научной литературы. Осуществлён обзор современных технологических подходов к получению белковых ингредиентов, включая биокаталитические и мембранные технологии, с акцентом на возможности переработки вторичного сырья животного происхождения и получения из него биоактивных пептидов с доказанным биологическим эффектом. Таким образом, данный раздел закладывает прочную теоретическую базу и отражает глубокое понимание современных научных трендов.

На втором и третьем этапах автор последовательно раскрывает реализацию научной концепции. Особое внимание уделено оценке потенциала сырьевой базы Сибирского федерального округа, обоснованию

выбора технологических решений и оптимизации условий ферментативного гидролиза. Проведены обоснованные эксперименты по подбору ферментов, установлены взаимосвязи между параметрами процесса и его эффективностью. Данные этапы демонстрируют высокий уровень экспериментального планирования и точности исследовательского подхода.

На четвёртом и пятом этапах диссертации отражена глубокая проработка постгидролитической стадии: автором научно обосновано применение баромембранных технологий фильтрации и концентрирования, оптимизированы режимы распылительной сушки, проведены всесторонние физико-химические и молекулярные исследования образцов. Особо следует отметить блок молекулярного моделирования *in silico*, направленный на предсказание биологических свойств полученных пептидов, что подчёркивает высокий уровень научной проработки и соответствие современным требованиям оценки структур.

Шестой этап исследования включает *in vivo*-эксперименты, выполненные в соответствии с нормами биоэтики. Автором представлены результаты комплексной биологической оценки образцов, включающей гематологические, морфологические, биохимические и гистологические показатели, а также оценку заживляющих свойств выработанных гидролизатов коллагена. Данный этап демонстрирует высокий уровень проработки и подтверждает практическую ценность полученных продуктов.

Заключительный этап работы посвящён оценке технологических рисков, расчёту экономической эффективности и разработке технической документации, необходимой для внедрения технологии в производство. Проведённая производственная апробация подчёркивает высокий уровень прикладной значимости работы и её готовность к внедрению в промышленный сектор.

В целом, структура, содержание и глубина проработки диссертационной работы Ворошилина Р.А. полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук. Работа охватывает широкий спектр междисциплинарных задач и демонстрирует зрелость научного мышления автора.

Публикация результатов исследований

Основные положения диссертационной работы опубликованы в 80 научных публикациях, включая статьи в изданиях, индексируемых в Scopus и Web of Science, и журналах, рекомендованных ВАК, что свидетельствует о признании научного сообщества. Также результаты работы представлены в монографии, четырех патентах РФ и научных отчетах.

Соответствие содержания автореферата основным идеям и выводам диссертации.

Автореферат отражает основное содержание диссертационной работы.

Вопросы, замечания и рекомендации по диссертационной работе

Несмотря на общую положительную оценку диссертационной работы, выполненной Ворошилиным Р.А., имеются следующие вопросы, замечания и рекомендации:

1. В разделе 1.6 главы 1 «Аналитический обзор», в таблицах 1.6.1, 1.6.2, 1.6.3 и 1.6.4 представлены данные из научной литературы. Однако, следует отметить, что в указанных таблицах отсутствуют соответствующие ссылки на первоисточники.

2. В главе 2 недостаточно полно приведена информация об используемых ферментах, как липазах, так и протеазах.

3. Следует пояснить процесс проведения эксперимента по обезжириванию исследуемого сырья (с. 121-123). Обезжиривание выполняется в ферментере? Указано, что производилась многократная

промывка сырья в процессе ферментации, но при этом не указано, добавляется ли после каждой промывки фермент или нет?

4. При выборе протеолитических ферментов (раздел 4.1) учитывались ли особенности аминокислотного состава коллагена, почему выбраны рассматриваемые протеиназы?

5. С какой целью проводили сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) сухих исследуемых гидролизатов коллагена?

6. В главе 5 автором представлены результаты оценки потенциальных биоактивных свойств пептидов гидролизатов коллагена. На основании каких характеристик было сделано заключение о потенциальных биоактивных свойствах исследуемых гидролизатов коллагена (раздел 5.4)?

7. Сама 5 глава построена на использовании онлайн сервиса, по сути черного ящика. Поясните, по каким принципам строилось построение модели белков и насколько полученные структуры соотносятся с реальностью и была ли подтверждена каким-то иным способом структура?

8. Полученные гидролизаты являются готовым продуктом? Если да, то непонятно конкретное назначение каждого вида гидролизата. Или же это основа для производство каких-либо иных продуктов сельскохозяйственного, пищевого, медицинского назначения?

9. Несмотря на успешную апробацию технологии, в диссертации недостаточно рассмотрены вопросы токсикологической безопасности исследуемых гидролизатов коллагена.

Высказанные замечания не снижают общего положительного впечатления от работы, ее научную ценность и практическую значимость.

Заключение по диссертационной работе

Диссертационная работа Ворошилина Романа Алексеевича является завершённым научным трудом, в котором получены новые значимые результаты, соответствующие современному уровню развития науки.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, обоснованности выводов и рекомендаций диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. в действующей редакции, предъявляемым Министерством науки и высшего образования Российской Федерации к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Ворошилин Роман Алексеевич заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по научной специальности 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
профессор, заведующий кафедрой
технологии мясных и молочных
продуктов, ФГБОУ ВО «КНИТУ»



Ежкова Галина Олеговна

Ежкова Галина Олеговна, доктор биологических наук (03.00.23 – Биотехнология), федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»), заведующий кафедрой технологии мясных и молочных продуктов
420015 г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68, +7(843)231-43-73,
e-mail: egkova@kstu.ru

