

В диссертационный совет 24.1.257.01
при ФГБНУ «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
109316. г. Москва, ул. Талалихина, 26

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Донской Галины Андреевны на диссертационную работу Купаевой Надежды Владимировны на тему: «Научное обоснование и практическое применение антиоксидантов растительного сырья при производстве мясного паштета», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальностям 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ и 4.3.3 – Пищевые системы.

Актуальность темы диссертации

Роли антиоксидантов в профилактике различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, онкологических, противовоспалительных и ряда других отводится всё большее место. При этом важно установить не только требуемое количество, но и безопасность выбранного антиоксиданта. Естественно, что предпочтение отдают антиоксидантам природного происхождения. В связи с этим использование антиоксидантов растительного сырья в качестве функциональных ингредиентов пищевых продуктов является безусловно перспективным направлением. Такой интерес к антиоксидантам обусловлен прежде всего их ключевой ролью в нормализации функционирования антиоксидантной системы организма. Диссертационная работа Купаевой Н.В. посвящена изучению антиоксидантного потенциала продуктов переработки репчатого лука и возможности использования их при производстве мясного паштета.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформированных в диссертации

Изложенные в диссертации научные положения, выводы и рекомендации обусловлены анализом современной научной литературы и полученными экспериментальными данными. Для выполнения работы использованы современные методы анализа и статистической обработки. Полученные экспериментальные данные представлены в табличном и графическом видах, описаны и сопоставлены с результатами других научных исследований. Основные положения работы представлены и обсуждены на 8 международных и всероссийских конференциях и саммитах. Тема и содержание работы соответствуют паспортам специальностей 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ и 4.3.3 – Пищевые системы, а сделанные выводы соответствуют поставленным цели и задачам.

Цель данной работы – научное обоснование применения антиоксидантов шелухи лука репчатого в производстве мясного паштета.

Научная новизна работы - впервые комплексно изучены антиоксидантные свойства шелухи лука репчатого, установлены соотношения типов антиоксидантов по силе их действия, обоснованы и систематизированы методы определения антиоксидантного потенциала растительного сырья. Определены динамика изменения общей антиоксидантной емкости экстракта шелухи желтого лука при хранении и сохранность его антиоксидантных свойств в мясной матрице. Установлено комплексное влияние экстракта шелухи желтого лука репчатого и мясного паштета с его внесением на организм биообъектов.

Теоретическая значимость полученных результатов заключается в научном подтверждении того, что количество антиоксидантов и значение общей антиоксидантной емкости не находятся в прямой зависимости от величины их активности. Общая антиоксидантная емкость экстракта шелухи желтого лука в процессе хранения характеризуется динамичностью и

взаимовосполняемостью за счет разных механизмов действия антиоксидантов.

Практическая значимость - продемонстрирована целесообразность использования вторичного сырья переработки желтого репчатого лука в качестве источника растительных антиоксидантов для придания продуктам питания антиоксидантных свойств. Разработаны технологии получения экстракта шелухи лука репчатого и мясного паштета с антиоксидантными свойствами, биологический эффект которых продемонстрирован в эксперименте *in vivo* на теплокровных животных.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней»

Диссертационная работа и автореферат Купаевой Н.В. соответствуют требованиям ВАК Российской Федерации. Работа имеет классическую структуру и включает введение, обзор литературы (глава 1), схему организации эксперимента, объекты и методы исследования (глава 2), экспериментальную часть (глава 3), заключение, список сокращений, список использованной литературы и приложения. Диссертация изложена на 185 страницах, содержит 56 таблиц, 29 рисунков, 309 источников литературы и 7 приложений. По объему, содержанию и выводам работа представляет последовательное, логичное и завершенное исследование, включающее три больших этапа. Результаты проведенных исследований опубликованы в 25 печатных работах, 6 из которых в изданиях, индексируемых международными базами данных WOS и Scopus, в том числе 3 в Q1, 10 публикаций в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 9 – в сборниках научных трудов, материалов конференций.

Во введении диссертантом обоснована актуальность предлагаемой к защите работы, сформулированы цель и задачи исследования, указаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Показаны основные положения, выносимые на защиту; личный вклад автора и степень

достоверности полученных результатов, а также апробация результатов и количество публикаций по выполненным исследованиям.

Первая глава посвящена механизмам действия антиоксидантов (АО) и их классификации. Показано, что АО характеризуются разным антиоксидантным потенциалом (АОП), включающим в себя характеристику как антирадикальных свойств, так и величину антиоксидантной активности (АОА), представленных различным действием антиоксидантов. Антирадикальные свойства описывают возможность АО реагировать со свободными радикалами. АОА характеризует способность АО ингибировать процесс окисления, включающий множество реакций, в том числе регуляцию активности ферментов через ингибирование продукции оксидаз, способствующих образованию активных форм кислорода; или усиление активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза, глутатионредуктаза). К антиоксидантным процессам относят и способность АО взаимодействовать с ионами железа и меди, влияние на антиоксидантные реакции клеток через воздействие на их сигнальные пути.

Показана классификация АО на синтетические и натуральные (эндогенные и экзогенные). Эндогенные АО подразделяются на ферментативные и неферментативные. Приводится характеристика каждого АО. Показана важная роль экзогенных низкомолекулярных АО, не синтезируемых в организме, источником которых являются преимущественно продукты растительного происхождения. К этому разряду относится лук репчатый, шелуха которого содержит кверцетин и его производные.

В работе описаны методы определения антиоксидантных свойств растительного сырья и продуктов с их содержанием. Метод FRAP, основанный на окислительно-восстановительной реакции, принцип которого заключается в измерении восстановления, связанного в комплекс трёхвалентного железа, под действием АО. Аналог метода FRAP – CUPRAC метод, основанный на восстановлении заключённой в комплекс

двухвалентной меди, под действием АО. Фотометрический метод DPPH основан на измерении восстановительной способности АО в отношении хромогенного радикала. Спектрофотометрический метод радикала ABTS в процессе реакции с персульфатом калия образует стабильный свободный радикал, оптическая плотность которого снижается при взаимодействии с АО. Метод хемилюминесценции позволяет определять типы АО, их соотношение, характер взаимодействия АО со свободными радикалами и коррелирует с показателями клеточной антиоксидантной активности. ХЛ определяет антиоксидантную активность образцов и характеризует соединение, обладающее антиокислительными свойствами, общей антиоксидантной ёмкостью и антиоксидантной активностью, позволяет оценить действие АО качественно и количественно. Автором сформулированы методологический подход и этапы работ по определению АОП: первый – измерение общей антиоксидантной ёмкости по разным механизмам действия; второй – изучение химического состава сырья; третий – определение АОА исследуемого образца. Наиболее важным является показатель клеточной АОА, т.к. количество АО и их антиоксидантная ёмкость не прямо пропорциональны их активности. Заключительный этап исследований – влияние исследуемых АО на биообъекты. При этом предусмотрено не только изучение состояния антиоксидантной системы крови, но и определение показателей АОС в органах и тканях, и главное в печени и мозге, которые в первую очередь реагируют на поступление АО. Для изучения влияния АО на организм и понимания их механизма действия автор использовал метод главных компонент, позволяющий обнаружить взаимосвязь изменения показателей и их взаимодействие друг с другом.

Во второй главе показаны организация эксперимента, объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись водные и спиртовые экстракты шелухи красного, жёлтого и белого репчатого лука; мясные паштеты с экстрактами лука; лабораторные животные, потреблявшие опытные

продукты и общевиварный рацион; биологический материал – кровь, плазма, сыворотка крови, печень, мозг, почка, мышцы, полученные от животных.

Представлена схема организации исследования. Для определения показателей качества и безопасности объектов исследования диссертант использовал стандартные химические, физико-химические, гистологические, микробиологические, биохимические, гематологические, электрофоретические, хроматомасс-спектрометрические, органолептические методы. Для измерения общей антиоксидантной ёмкости использовали методы ORAC, FRAP, DPPH. Показано приготовление экстрактов, описаны методы определения антиоксидантной ёмкости различными способами. Определены процент сохранности и общее количество фенольных соединений экстракта шелухи лука при внесении его в мясной паштет. Определены типы АО и их соотношение методом ХЛ. Определена клеточная АОА этанольных экстрактов шелухи репчатого лука с применением стандартной клеточной культуры НТ-29, полученной из коллекции института вирусологии. В работе использовано огромное количество стандартных методов, в том числе: определение концентраций гексахлорциклогексана, гептохлора, алдрина, ДДТ и его метаболитов, макро- и микроэлементов Fe, Cu, Zn, Pb, Cd, Mg, Na, K, Mn, Ca, Se, Hg; определение массовой доли влаги; энергетическую ценность; жирнокислотный и аминокислотный составы, биологическая ценность белка опытных паштетов. В перечень микробиологических показателей входили: мезофильные аэробные и факультативные аэробные микроорганизмы, БГКП, сульфитредуцирующие клостридии, золотистый стафилококк, сальмонелла, бактерии рода *Proteus*, дрожжи и плесени, *E.Coli*, бактерии рода *Pseudomonas*.

Окислительную порчу паштетов автор определял путём измерения концентрации летучих жирных кислот, аминоаммиачного азота, тиобарбитурового числа, кислотного и перекисного чисел. Визуализированные белковые фракции мясных паштетов определяли с использованием одномерного вертикального электрофореза. Компьютерную денсиметрию одномерных электрофореграмм осуществляли с помощью

сканера Bio – 5000 Plus. Изучение гистологических препаратов паштета и их фотографирование проводили на световом микроскопе «AxioImager A1» с применением программы анализа изображений «Axio Vision 4.7.1.0».

Для моделирования экспериментального пищеварения и сохранности АО использовали модель переваримости Покровского-Ертанова.

Общие антиоксидантные ёмкости в гидролизатах паштета определяли методами FRAP и DPPH. Исследование влияния экстракта шелухи жёлтого лука и паштета с его добавлением проводили на крысах-самцах линии Вистар.

Группа 1 употребляла на протяжении эксперимента стандартный общевиварный рацион (24 г/гол); 2-я группа опытная потребляла стандартный общевиварный рацион (14 г/гол) и опытный продукт (10 г/гол); 3-я гр. употребляла на протяжении эксперимента стандартный рацион (24 г/гол) при ежедневном внутрижелудочном введении экстракта луковой шелухи (2,7 мл/гол); 4-я гр. употребляла стандартный общевиварный рацион (14 г/гол) и контрольный продукт (10 г/гол). В таблице 5 представлено потребление питательных веществ одним животным в течении всего эксперимента. На 28 сутки животных усыпляли. Абсолютную массу мозга, печени, почек, селезёнки, сердца, тимуса определяли взвешиванием на электронных весах. У животных отбирали печень, мозг, мышцы, кровь из сердца для анализа показателей цельной крови, для определения параметров антиоксидантной системы организма в плазме крови, для получения сыворотки. Содержание общего белка, альбумина, креатинина, мочевины, билирубина, мочевины, Са, Mg, Fe, холестерина высокой и низкой плотности, активности АсАт, АлАт, щелочной фосфатазы, ГГТ, ЛДГ определяли на биохимическом анализаторе. В крови животных определяли эритроциты, гемоглобин, гематокрит, средний объём эритроцита, тромбоциты, тромбоцит, средний объём тромбоцита и распределение тромбоцитов на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior Vet 2.7, используя специальные наборы реактивов.

Содержание лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов определяли на проточном цитометре. Содержание лейкоцитов определяли расчётным путём.

Показатели АОС: глутатионпероксидазу, супероксиддисмутазу, каталазу, концентрацию восстановленного глутатиона определяли в образцах плазмы крови и экстрактах органов и мышц животных. Оценку изменения показателей функционального состояния организма биообъектов и антиоксидантной системы определяли методом главных компонент.

В третьей главе представлены результаты экспериментальных исследований. В разделе 3.1 продемонстрированы результаты комплексного изучения антиоксидантного потенциала вторичного сырья переработки красного, желтого и белого лука репчатого с использованием современных методов анализа. Исследование включало определение общей антиоксидантной емкости, качественно-количественного состава, клеточной антиоксидантной активности и установление соотношения типов антиоксидантов по силе их действия. Показано, что наибольшими значениями ОАЕ отличалась шелуха красного лука. При идентификации АО представлено количественное определение основных флавоноидов в экстрактах шелухи различных видов лука. Обнаружено более 100 соединений. Основными флавоноидами, обнаруженными в экстрактах шелухи красного и жёлтого лука, были кверцетин и спиреозид, концентрация которых составляла не менее 53% от общего количества флавоноидов. Суммарное содержание флавоноидов в водно-спиртовых экстрактах красного лука было самым высоким, превышая значение шелухи жёлтого лука в 3,5 раза. При исследовании кинетических кривых ХЛ установлено, что нейтрализация кислородсодержащих свободных радикалов возможна тремя типами АО – сильными, средними и слабыми. Установлено, что вклад в величину ОАЕ экстрактов шелухи красного и жёлтого лука вносят все три типа АО. При этом шелуха жёлтого лука характеризовалась более равномерным распределением АО по типам. По результатам исследований обоснована целесообразность использования вторичного сырья желтого лука репчатого в качестве источника растительных антиоксидантов.

В разделе 3.2 описана технологическая схема получения экстракта шелухи желтого лука и представлены экспериментальные данные по изменению его общей антиоксидантной емкости в процессе хранения. В соответствии с нормативными документами определены показатели качества и безопасности экстракта. По результатам исследования разработаны ТИ и ТУ по производству экстракта шелухи желтого лука, предназначенного для применения в пищевой промышленности. В разделе 3.3 отражены результаты изучения сохранности антиоксидантных свойств и фенольных соединений экстракта шелухи желтого лука в мясной матрице. Установлено оптимальное количество внесения экстракта в мясной паштет для повышения антиоксидантной емкости в течение 21 суток. Описана технология производства и рецептура мясного паштета антиоксидантного действия. В готовых продуктах определены химический состав, пищевая ценность, концентрации фенольных соединений, содержание витаминов, макро- и микроэлементов, жирнокислотный и аминокислотный составы, показатели биологической ценности. Определены показатели ОАЕ методами FRAP и DPPH в гидролизатах паштетов. Представлены протеомный и микроструктурный составы продуктов. Продемонстрированы результаты определения показателей качества и безопасности продукта (токсичные элементы, микробиологические показатели, концентрации аминокислотного азота, перекисные и кислотные числа, активная кислотность, значения тиобарбитурового числа, концентрации летучих жирных кислот в процессе хранения). Установлены сроки годности и рассчитана экономическая эффективность производства паштета. Раздел 3.4 посвящен исследованиям по изучению влияния экстракта шелухи желтого лука и мясного паштета с его внесением на организм лабораторных животных. По результатам эксперимента *in vivo* явных закономерностей в изменении всех показателей антиоксидантной системы выявлено не было. Статистически достоверным для опытной группы 2, получавшей опытный паштет, было снижение интегрального показателя хронической интоксикации тимуса и возрастание

значения для мозга, соответственно, на 30,8% и 8,9% относительно интактной группы 1. Диссертантом проведен цитометрический анализ крови животных. Определены лейкоциты, лимфоциты, моноциты, гранулоциты и их относительное содержание. В крови опытных животных (группа 2), относительно крови интактных животных, отмечено снижение лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов. В группе крыс, потреблявших опытный продукт, относительное содержание моноцитов снизилось на 35,2%. Среди функциональных показателей цельной крови животных отмечено снижение концентрации тромбоцитов при потреблении опытного продукта в сравнении с группой 1. Проведен биохимический анализ сыворотки крови биообъектов. Отмечены значимое снижение мочевины в группе, потреблявшей опытный продукт, тенденция снижения щелочной фосфатазы, снижение магния при повышении концентрации железа на 20-28%, снижение триглицеридов, относительно контрольной группы. Общий холестерин сыворотки крови животных, потреблявших опытный продукт, увеличился за счёт роста холестерина высокой плотности. При определении показателей АОС в плазме крови крыс существенных изменений не выявлено. Отмечено снижение содержания восстановленного глутатиона в плазме крови крыс, потреблявших опытный продукт и ЭШЛ в сравнении с интактной группой. Увеличение активности супероксиддисмутазы, относительно опытной группы 2 на 13,6%, отмечено в группе, потреблявшей ЭШЛ. Показатели общей антиоксидантной емкости FRAP в печени животных, потреблявших опытный и контрольный паштеты, увеличивались, соответственно, на 23,7% и 11,3% в сравнении с группой 1. В опытных группах прослеживалась тенденция и увеличению продуктов ПОЛ. Отмечалась тенденция к увеличению активности каталазы в тканях печени крыс, потреблявших опытный продукт. Снижение ОАЕ в тканях мозга животных происходило при потреблении опытного продукта, в сравнении с интактной и потреблявшей ЭШЛ, на 9,4-10,1% при резком снижении концентрации ТБК-АП в 2-2,3 раза. Показатели ОАЕ в мышцах спины экспериментальных животных значимо не различались. При этом

потребление животными опытного продукта, внутрижелудочное введение ЭШЛ, а также потребление контрольного продукта способствовало росту глутатиона на 6,2-4,9% относительно интактной группы. Методом главных компонент с использованием языка программирования R было установлено, что антиоксиданты шелухи желтого лука репчатого и мясной продукт с их внесением проявляли комплексное влияние на организм биообъектов, в том числе на кровь, мозг, печень, мышцы лабораторных животных; оказывали влияние на липидный профиль и уровень глюкозы в сыворотке крови. Для получения сделанных выводов автор использовал огромное количество различных методов, число которых выходит за пределы одной диссертации.

Материалы, представленные в автореферате, в полной мере отражают результаты диссертационной работы.

Замечания, вопросы и рекомендации по диссертации:

Хотелось бы уточнить, почему несмотря на большую ОАЕ шелухи красного лука предпочтение отдано шелухе жёлтого лука?

Каким образом соотношение типов АО по силе их действия влияет на АОП экстракта шелухи желтого лука?

Чем можно объяснить разницу гемоглобина в показателях крови животных второй и третьей групп?

Отмечены ряд недостатков, не снижающих ценность выполненной работы. Например, на рис. 44 «Динамика изменчивости масс тела крыс в течение эксперимента» трудно графически определить группу крыс.

Название раздела 3.4 не соответствует в полной мере его содержанию.

Имеющиеся опiski и ошибки в написании на некоторых страницах, в том числе, на 10,11, 18, 22, 30, 39, 47-49, 89, 111, 137, 141, необходимо исправить.

Заключение по диссертации

Оппонируемая работа «Научное обоснование и практическое применение антиоксидантов растительного сырья при производстве мясного паштета» Купаевой Надежды Владимировны представляет собой

законченную научно-квалификационную работу и соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), представляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата технических наук. Считаю, что её автор Купаева Н.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальностям 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ и 4.3.3 – Пищевые системы.

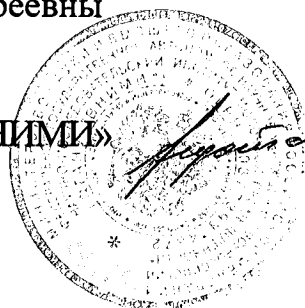
Научный консультант
лаборатории технологий
функциональных продуктов
ФГАНУ «ВНИМИ», доктор
биологических наук по научной
специальности – 03.00.01
«Радиобиология»

Донская
Галина Андреевна

Галина Андреевна
22.08.24.

Подпись Донской Галины Андреевны
подтверждаю:

Ученый секретарь ФГАНУ «ВНИМИ»
Доктор технических наук



Ольга Борисовна
Федотова