

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, профессора Мазо Владимира Кимовича 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 выполненной работы. К одному из важных достижений науки о питании следует отнести установление значения многих минорных биологически активных веществ (БАВ) как растительного, так и животного происхождения, обладающих антиоксидантными свойствами для сохранения здоровья и, в еще большей степени, для снижения риска алиментарно зависимых заболеваний. Шелуха лука как сельскохозяйственный отход и одновременно источник антиоксидантов является перспективным потенциальным сырьем для соответствующей переработки и включения в состав специализированной пищевой продукции. Тем не менее, антиоксидантный профиль шелухи лука, являющегося широко распространенной сельскохозяйственной культурой во всем мире, изучен недостаточно. Соответственно, диссертационная работа Купаевой Надежды Владимировны, целью которой явилось научное обоснование практического применения антиоксидантов вторичного сырья переработки лука репчатого в производстве мясного паштета на основе комплексного изучения его антиоксидантного потенциала несомненно **актуальна**. В диссертации

предлагается и обосновывается рациональное и целенаправленное использование водно-спиртового экстракта из вторичного сырья (шелухи лука) в составе мясного пищевого продукта, антиоксидантные свойства которого подтверждаются в проведенном исследовании результатами опытов *in vitro* и *in vivo*. Представленная диссертация соответствует современным тенденциям развития отечественного агропромышленного сектора: переходу к экологически чистому агрохозяйству, хранению и эффективной комплексной переработке сельскохозяйственной продукции, созданию безопасной и качественной, пищевой продукции (в том числе специализированной пищевой продукции с доказанной эффективностью).

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации. Достоверность результатов, полученных в проведенном Купаевой Н.В. исследовании, их анализ и обсуждение с привлечением отечественных и зарубежных научных публикаций, а также широкая апробация в рамках представительных научных конференций подтверждают обоснованность и достоверность научных положений и выводов, представленных в заключении диссертации. Разработанная техническая документация (технические условия и технологические инструкции), акты выработки продукта и результаты его апробации позволяют надежно обосновать сформулированные практические рекомендации.

Научная новизна работы.

В диссертации получены результаты, отвечающие высокому критерию научной новизны. К ним могут быть отнесены, во-первых, данные, комплексно характеризующие антиоксидантные свойства экстрактов шелухи красного, желтого и белого репчатого лука, а именно: количественные значения общих антиоксидантных емкостей экстрактов, содержание основных антиоксидантов в составах экстрактов и их вклад в проявления общей антиоксидантной активности. Во-вторых, значительный интерес представляют результаты, характеризующие изменения общей

антиоксидантной емкости шелухи желтого лука при хранении и его внесении в мясную матрицу. В-третьих, существенной научной новизной обладают результаты исследований *in vivo*, свидетельствующие с позиций доказательной медицины о стимулирующем влиянии потребления антиоксидантов шелухи лука в составе мясного паштета на антиоксидантный статус (антиоксидантные системы крови, мозга, печени, мышц) лабораторных грызунов-крыс линии Вистар.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов. Полученные с использованием метода главных компонент результаты исследований *in vivo* представляют теоретический интерес как для экспериментальной биологии, так и клинической нутрициологии, поскольку свидетельствуют о вызываемом потреблением антиоксидантов изменении таких биохимических маркеров крови, как липидный профиль, индекс атерогенности, уровень глюкозы у лабораторных грызунов. Практическая значимость определяется технологическим разделом диссертационной работы.

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

Диссертационная работа Купаевой Н.В. состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, четырех экспериментальных глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, приложения. Список использованных источников литературы включает 309 наименований, из которых 217 – иностранных. Приложения к диссертации содержат копии титульных листов ТИ и ТУ по производству экстракта шелухи лука репчатого и паштета мясного «Баланс» антиоксидантного действия, акты выработки паштета. Основное содержание работы изложено на 144 страницах машинописного текста, содержит 56 таблиц и 29 рисунков. Автореферат включает 27 страниц, достаточно полно отражает содержание работы, реализацию задач для достижения поставленной цели, с логично представленными выводами.

Содержание работы отражено в публикациях автора. Диссертация и автореферат по содержанию, структуре и объему соответствуют требованиям «Положения о присуждении ученых степеней».

В разделе «Введение» аргументированно обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и основные задачи исследования, включающие анализ данных научной литературы по проблеме антиоксидантов, апробации и использования в работе широкого спектра методов определения антиоксидантного потенциала тестируемых объектов (шелухи лука и мясного паштета), *in vitro* и *in vivo*, разработку соответствующей технической документации. Технические погрешности и отдельные неудачные выражения встречаются в этом разделе диссертации на страницах 5 и 6.

В первой главе диссертации «Обзор литературы» широко представлены научные публикации, посвященные, во-первых, различным аспектам общей проблемы физико-химии антиоксидантов и их воздействия на биологические объекты, во-вторых, характеристике антиоксидантных свойств вторичного растительного сырья и анализу технологических подходов к его переработке для использования в составе пищевой продукции, и в третьих, обзору методов определения антиоксидантных свойств растительного сырья как такового, так и в составе пищевых продуктов. Обзор изложен на страницах и написан, как и другие разделы диссертационной работы, хорошим литературным языком, отвечающим правилам принятым современным научным сообществом. Анализ обсуждаемых публикаций, в частности механизмов взаимодействия ферментативной и неферментативной систем организма с активными формами кислорода свидетельствует о высокой профессиональной квалификации Надежды Владимировны Купаевой. В заключении по обзору литературы автором диссертации предлагается достаточно общий методологический подход (схема на рисунке 14), позволяющий надежно изучать антиоксидантные свойства растительного сырья. Этот подход и был

использован в диссертационной работе при организации многоэтапного эксперимента, основными конечными результатами которого явились характеристика биологических эффектов потребления лабораторными грызунами экстракта шелухи желтого репчатого лука и содержащего его мясного паштета, а также разработка соответствующей технической документации. Технические погрешности и отдельные неудачные выражения встречаются в этом разделе диссертации на страницах 8, 10, 11-13, 15, 17, 19-22, 27, 30, 31, 34, 35, 37, 39, 40, 42, 43, 45-47.

Во второй главе диссертации представлены материалы и методы исследования, свидетельствующие о высоком современном методическом уровне диссертационной работы, соответствующем её цели и задачам. Объектами исследования являлись: 1. Этанольные экстракты шелухи красного, желтого и белого репчатого лука; зелень сушеная «Базилик», «Розмарин». 2. Модельные мясные паштеты и изготовленные в соответствии с рецептурой паштета «Говяжий» категории А по ГОСТ Р 55334 без добавления 70% водно-этанольного экстракта шелухи желтого репчатого лука (ЭШЛ) и паштеты, в которые ЭШЛ был добавлен. 3. Лабораторные грызуны: крысы-самцы Вистар, потреблявшие общевиварный рацион, экстракт шелухи желтого репчатого лука или паштеты, не содержащие или содержащие ЭШЛ. Был исследован биологический материал (кровь, плазма и сыворотка крови, печень, мозг, почка, мышцы (*M. longissimus dorsi* и *M. Femoris*)).

Методы определения антиоксидантного потенциала включали: 1. Определение общей антиоксидантной емкости флуориметрическим методом Oxygen Radical Absorbance Power (OAE_{ORAC}), спектрометрическим методом Ferric Reducing Antioxidant Power (OAE_{FRAP}) и методом радикала DPPH (OAE_{DPPH}). 2. Идентификация и количественное определение антиоксидантов проводили методом жидкостной хроматографии в сочетании с квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром с электрораспылением. Кверцетин использовался в качестве стандарта для

определения количественного содержания фенольных соединений. 3. Определение типов антиоксидантов и их соотношения методом хемилюминесценции. 4. Определение содержания активных продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой. 5. Определение клеточной антиоксидантной активности (с использованием стандартной клеточной культуры НТ-29). Для характеристики составов мясных паштетов, их соответствия требованиям санитарно-химической и микробиологической безопасности был также использован необходимый набор методов определения микроэлементного, витаминного, жирно-кислотного и аминокислотного составов, содержания влаги, этанола, переваримости, микробиологических и других показателей. Исследование влияния потребления водно-этанольного экстракта шелухи желтого лука репчатого и мясных паштетов, содержащих этот экстракт, проводили в эксперименте на крысах-самцах Вистар ($n=40$) массой 423 ± 39 г (продолжительность 28 суток). Эксперимент был одобрен биоэтической комиссией ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН. На протяжении всего периода эксперимента крысы потребляли в качестве стандартного общевиварного рациона комбикорм (ежедневно осуществлялся учет потребленного рациона и выпитой воды, массу тела определяли каждые трое суток). Крысы случайным образом были распределены на группы: группа 1 – интактные животные, потреблявшие на протяжении всего эксперимента стандартный общевиварный рацион (24 г/гол), группа 2 – крысы, потреблявшие стандартный общевиварный рацион (14 г/гол) и опытный продукт (10 г/гол), группа 3 – крысы, потреблявшие стандартный общевиварный рацион (24 г/гол) и внутрижелудочно – экстракт луковой шелухи (в объеме 2,7 мл/голову с $ОАЕ_{FRAP}$ 2 мкмоль-экв. кверцетина), группа 4 – крысы, потреблявшие стандартный общевиварный рацион (14 г/гол) и контрольный продукт (10 г/гол). **Биологический материал**, полученный после выведения животных из эксперимента, был проанализирован и охарактеризован с помощью соответствующего комплекса биохимических, гематологических,

цитометрических методов. Были определены уровни перекисного окисления липидов (ПОЛ), концентрации восстановленного глутатиона (GSH), общего холестерина (ХС), триглицеридов, ХС ЛПВП ХС ЛПНП, активности каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и другие показатели. Технические погрешности и отдельные неудачные выражения встречаются в этом разделе диссертации на страницах 49, 52, 60, 68, 71.

В третьей главе диссертации представлены результаты сравнительных исследований общей антиоксидантной емкости и идентификации основных антиоксидантов этанольных и водных экстрактов шелухи лука. Показано, что количество полифенольных соединений было выше в спиртовых экстрактах, кверцетин и спиреозид были основными флавоноидами, обнаруженными в экстрактах луковой шелухи. Для водно-спиртовых экстрактов луковой шелухи были определены проценты свободно-радикального окисления и клеточной антиоксидантной активности с использованием клеточной культуры НТ-29. Также были охарактеризованы соотношения типов антиоксидантов (в составе экстрактов луковой шелухи) по силе их антиоксидантного действия *in vitro*. По результатам проведенных исследований для введения в состав мясной матрицы был выбран экстракт шелухи желтого репчатого лука и, соответственно, исследованы сохранность его антиоксидантных свойств, показатели качества и безопасности. При разработке технологии мясного паштета с внесением 70% водно-этанольного экстракта шелухи желтого лука репчатого были изучены сохранность его антиоксидантных свойств в мясной матрице и влияние на свойства продукта. Было определено оптимальное содержание экстракта шелухи лука в разработанном продукте – мясном паштете, разработана технология его производства, охарактеризованы *in vitro* антиоксидантные свойства, химический состав, биологическая и пищевая ценности, установлен срок годности и дана оценка экономической эффективности производства продукта. Соответственно, разработаны и представлены в приложениях к

диссертации ТИ и ТУ 10.13.14-151-0041977 по производству мясного паштета антиоксидантного действия.

Результаты эксперимента *in vivo* по выявлению влияния экстракта шелухи лука и мясных паштетов на организм лабораторных грызунов представлены в диссертации на рисунке 44 и в таблицах 45-56. Наиболее интересные из этих результатов (по мнению оппонента) следующие. В сыворотке крови крыс, потреблявших стандартный общевиварный рацион и опытный продукт (группа 2), и крыс, потреблявших стандартный общевиварный рацион и внутривентрикулярно – экстракт луковой шелухи (группа 3), отмечена, соответственно, тенденция к снижению концентрации глюкозы на 12,9% и 6,1% и индекса атерогенности по сравнению с животными контрольной группы 1. Содержание общего холестерина (ХС) у животных группы 2 возросло по сравнению с группами 1 и 3 на 21,4% ($p < 0,05$) и 26,7% ($p < 0,05$), соответственно, в основном вследствие повышения концентрации ХС ЛПВП. В плазме крови показатели антиоксидантной системы существенно не изменялись при потреблении антиоксидантов шелухи лука и мясных паштетов.

В печени животных группы 2 имело место наибольшее увеличение общей антиоксидантной емкости – ($ОАЕ_{FRAP}$), а в их мозге этот показатель, напротив, был снижен по сравнению с животными контрольной группы 1. В печени животных всех опытных групп отмечалось статистическое увеличение концентрации активных продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, а в тканях мозга животных опытной группы 2, напротив, данный показатель был ниже, чем в контрольной группе 1. Содержание восстановленного глутатиона и глутатионпероксидазы в мозге и печени статистически не различалось у животных всех групп.

По совокупности полученных результатов *in vivo* продемонстрировано, что на организм грызунов влияло как потребление антиоксидантов, так и смена рационов. Методом главных компонент (результаты представлены на рисунках 27-29) были установлены взаимосвязи изменчивости маркеров

антиоксидантной системы грызунов и изменчивости всего комплекса показателей, характеризующего состояния организма этих животных в целом. Технические погрешности и отдельные неудачные выражения встречаются в этом разделе диссертации на страницах 75, 77, 80, 86, 91, 93, 96-98, 102, 105, 107, 110, 112, 120, 121, 130, 137.

Заключение диссертации содержит 5 выводов, отражающих основные результаты проведенного исследования.

Замечания, вопросы и рекомендации по диссертации. Автору диссертации не удалось избежать в работе опечаток и неточностей, которые уже были отмечены выше. В порядке научной дискуссии требуют уточнения следующие вопросы:

1. При проведении статистической обработки результатов исследования для определения достоверности средних величин в качестве значимого уровня автором работы выбраны вероятности 0,1 и 0,05. Чем обусловлен такой выбор?

2. Что означает фраза «экстракт шелухи лука в зависимости от региона произрастания и сбора урожая будет одновременно характеризоваться различными величинами снижения и увеличения общей антиоксидантной активности в отношении разных механизмов действия»?

3. В таблице 28 (страница 110) приведен аминокислотный скор незаменимых аминокислот в составе паштетов. По какой из шкал ФАО/ВОЗ выбран эталонный белок?

4. Чем объясняется изменение общей антиоксидантной емкости паштетов при их переваривании *in vitro*?

5. Чем объясняется резкое повышение общей антиоксидантной емкости этанольных экстрактах опытного и контрольного образца паштетов на 7 сутки хранения?

6. В таблицах 54-56 представлены аббревиатуры показателей антиоксидантной системы, функциональных, цитометрических показателей крови и биохимических показателей сыворотки крови. К сожалению, рисунок 27 (А и Б), как он представлен на странице 137, не позволяет понять, для анализа биологического материала **какой группы (или групп) грызунов** был использован метод главных компонент?

По диссертации имеется **замечание методического характера**, которое следует учесть в последующей работе, а именно: при распределении животных по группам в эксперименте *in vivo* не была сформирована группа крыс, потребляющих стандартный общевиварный рацион, которым нужно было бы вводить внутривентрикулярно дистиллированную воду в том же объеме, что и крысам группы 3. Следует отметить, что сделанное замечание не влияет на высокую оценку проведенных в рамках диссертации исследований. Результаты диссертационной работы могут **быть рекомендованы и представить значительный интерес для специалистов, осуществляющих разработки по созданию новой специализированной пищевой продукции, эффективность которой отвечает требованиям доказательной медицины.**

Заключение по диссертации.

Диссертация Купаевой Надежды Владимировны «Научное обоснование и практическое применение антиоксидантов растительного сырья при производстве мясного паштета» по актуальности, научной новизне, полученным результатам, достоверности и обоснованности выводов является **завершенной научно-исследовательской работой.** Диссертационная работа соответствует пунктам 5, 6, 10, 29 и 30 паспорта специальности 4.3.5. «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ» и пунктам 2, 4, 5, 12 паспорта специальности 4.3.3. «Пищевые системы», требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842

от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), предъявляемых к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор Купаева Н.В. заслуживает присуждения искомой степени по специальностям 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ и 4.3.3 – Пищевые системы.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории пищевых
биотехнологий и
специализированных продуктов,
ФГБУН «ФИЦ питания и
биотехнологии», доктор
биологических наук по научной
специальности 03.01.04 –
«Биохимия», профессор
Почтовый адрес:
109240, г. Москва, Устьинский
проезд, дом 2/14
Номер телефона: +7 (495) 698-53-71
E-mail: mazo@ion.ru

Мазо
24.09.2024
Владимир
Кимович Мазо

Подпись Мазо Владимира Кимовича подтверждаю:

Ученый секретарь ФГБУН «ФИЦ
биотехнологии»
доктор медицинских наук, профессор



[Signature]
Инна Юрьевна
Тармаева