

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктор технических наук

Ольги Олеговны Бабич

на диссертационную работу Лосевой Анны Ивановны

«Теоретическое обоснование и практическая реализация технологий напитков, полученных с использованием вторичных метаболитов растительного сырья, культивируемого *in vitro*», представленную на соискание ученой степени
доктора технических наук по специальностям

4.3.3. Пищевые системы,

4.3.5. Биотехнология продуктов питания
и биологически активных веществ

Актуальность

Высокая востребованность сырьевой базы, ограниченность естественных ресурсов, возрастающие требования к уровню и качеству человеческой жизни диктуют необходимость разработки прогрессивных технологий в различных отраслях, особенно в пищевой промышленности. Известным решением является использование в качестве пищевого сырья растений, синтезирующих и накапливающих в процессе роста вторичные метаболиты и обладающих важнейшими фармакологическими свойствами. Перспективным для создания новейших технологий в производстве натуральных продуктов является использование клеточных культур растений *in vitro* - возобновляемого, экологически чистого сырья. Культивирование трансформированных *in vitro* каллусных, суспензионных и корневых культур с точки зрения управляемого получения биологически активных веществ, их качественного и количественного состава, представляют значительный интерес, как для научных исследований, так и для производства. Экстракты, полученные из клеточных культур, содержат природный комплекс биологически активных веществ и могут использоваться как перспективное сырье для производства обогащенных продуктов питания.

На основании вышеизложенного диссертационная работа Лосевой А.И., по разработке технологий напитков, полученных с использованием вторичных

метаболитов растительного сырья, культивируемого *in vitro*, актуальна и своевременна.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Лосевой А.И.. представлена в традиционном изложении, состоит из введения, восьми глав, результатов и выводов, списка использованных литературных источников и приложений. Основной текст изложен на 378 страницах, содержит 117 таблиц, 112 рисунков. Список литературных источников включает 469 наименований, в том числе 427 на английском языке.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи, необходимые для реализации поставленной цели, научная новизна и практическая значимость. Представлены положения, выносимые на защиту. Обосновано соответствие диссертационной работы паспортам научных специальностей 4.3.3 и 4.3.5.

В первой главе представлен подробный анализ научно-технической литературы о тенденциях развития технологий и мировой опыт изучения химического состава и фармакологических свойств растений, анализ перспектив использования клеточных культур *in vitro* растений для получения вторичных метаболитов, технологий их экстракции и выделения, представлен обзор рынка растительных экстрактов и БАВ для разных отраслей промышленности, рынка функциональных продуктов на основе вторичных метаболитов растений.

Автором детально проработана литература по теме диссертации, анализ которой позволил сформулировать цель и задачи исследований. Изложение материала свидетельствует о глубоких познаниях диссертанта по изучаемой проблеме и умении работать с литературой.

Во второй главе «Организация, объекты и методы проведения исследований» представлена методология и организация работы. Отражены объекты и методы исследования. Весь комплекс исследований разделен на 3 блока: теоретические исследования, экспериментальные исследования и

практическая реализация результатов исследований. При проведении исследований автор использует стандартные, общепринятые и специальные биологические и физико-химические методы исследования. Используемые методы исследований адекватны поставленным задачам. Использование в работе современных методов исследования свидетельствует о достоверности полученных результатов.

В третьей главе «Изучение свойств исходного растительного сырья и перспектив его использования для извлечения вторичных метаболитов» автором представлены результаты оценки химического состава, показателей качества и безопасности исходного растительного сырья, результаты изучения биологической активности (антимикробной, антиоксидантной) *in vitro* надземных и подземных частей исходных растений, дана оценка перспектив использования выбранного растительного сырья для извлечения вторичных метаболитов с широким спектром биологической активности.

В четвертой главе «Культивирование клеточных культур *in vitro* и сравнительная характеристика способов экстракции комплекса БАВ из природного сырья и клеточных культур» диссертантом проведен подбор состава питательных сред и параметров культивирования клеточных культур растений, дана оценка ростовых характеристик эксплантов. Изучены разные виды экстракции комплекса БАВ из природного растительного сырья и клеточных культур. Результатом стали рекомендованные рациональные значения технологических параметров перколяции и микроволновой экстракции.

В пятой главе «Анализ компонентного состава, физико-химических свойств, показателей токсичности и биологической активности экстрактов, полученных разными методами» соискателем изучен качественный и количественный состав экстрактов из природного сырья и клеточных культур растений, содержащих флавоноиды, гликозиды, экидистероиды, хромоны и фенольные кислоты. Проведена оценка физико-химических свойств, содержание тяжелых металлов и степень ингибирования хемилюминесценции тест-штамма

Vibrio fischeri. Автором установлено соответствие всех исследуемых образцов экстрактов требованиям ОФС.1.4.1.0021.15 и ОФС.1.5.3.0009.15 по содержанию тяжелых металлов и токсичности, что свидетельствует о возможности их использования в технологиях пищевых продуктов. Изучены антимикробные и антиоксидантные свойства экстрактов.

В шестой главе «Подбор параметров очистки растительных экстрактов, полученных из природного сырья и клеточных культур» представлены результаты подбора параметров очистки экстрактов от балластных веществ двумя методами: ультрафильтрационным и хроматографическим. Контролируемыми параметрами являлись содержание действующих БАВ.

В седьмой главе «Подбор параметров концентрирования и сушки очищенных растительных экстрактов» диссертант представил результаты подбора рациональных параметров получения густых экстрактов из природного растительного сырья и клеточных культур и параметров сушки экстрактов распылительным и лиофильным способами, дает оценку компонентного состава и показателей качества высушенных экстрактов.

В восьмой главе «Практическая реализация результатов исследований» автор представил результаты разработки процессуальных схем производства густых и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений и напитков функциональной направленности на их основе. Диссертант оценил экономическую эффективность внедрения предлагаемых технологий и представил расчет себестоимости разработанных напитков. Разработал нормативную документацию на продукцию: густые и сухие растительные экстракты на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro* и функциональные напитки на их основе.

Автором проведены опытно-промышленная апробация и внедрение готовой продукции в производство ООО «РУСЭКСТРАКТ», ООО «НПО Сибирка», ООО НПО «Здоровое питание», ООО «СибБарс». Результаты исследований используются в учебном процессе Кемеровского государственного университета при подготовке студентов бакалавриата и

магистратуры, а также при организации научно-исследовательской и практической работы студентов.

Диссертационная работа завершается выводами, в которых отражены результаты экспериментальных исследований, выполненных автором и приведенных в диссертации. Сформулированные выводы соответствуют целям и задачам, поставленным в диссертации, и логически вытекают из результатов проведенных исследований.

Диссертационная работа написана грамотно, аккуратно оформлена, иллюстрирована графическими и табличными материалами, построена в соответствии с требованиями ВАК РФ. Представленные результаты исследований свидетельствуют о том, что диссертант Лосева А.И. провела большой объем теоретических и экспериментальных исследований.

Достоверность и новизна основных положений диссертации

Большой объем выполненных соискателем экспериментальных исследований с использованием традиционных, современных методов и статистической обработки подтверждает достоверность результатов и обоснованность научных положений диссертационной работы. Автором грамотно спланирована экспериментальная часть.

Экспериментальная часть работы выполнена на высоком уровне с использованием современных методов исследования. Для подтверждения достоверности полученных результатов в работе используются методы математической статистики.

Научные положения, представленные к защите, подтверждаются основными выводами диссертации и отражают новые результаты, полученные соискателем. Положения и основные выводы диссертационной работы теоретически обоснованы.

Научная новизна работы заключается в изучении химического состава, показателей качества и безопасности, а также биологической активности нативного растительного сырья (левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого,

диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной); в подборе рациональных параметров культивирования клеточных культур (каллусных и корневых) *in vitro*; разработке методологических подходов к выбору методики экстракции, очистки, концентрирования и сушки растительных экстрактов, полученных разными методами; изучения компонентного состава (содержание флавоноидов, тритерпеноидов, кумаринов, фенилпропаноидов, антоцианов), физико-химических свойств, биологической активности и показателей токсичности экстрактов природного сырья и клеточных культур растений; обосновании компонентного состава напитков на основе растительных экстрактов, оценке их показателей качества, безопасности и функциональных характеристик.

Необходимо подчеркнуть, что в результате диссертационной работы разработаны рецептуры и технологические схемы производства напитков на основе растительных экстрактов.

В целом научная новизна, а также достоверность полученных соискателем данных, положений и выводов не вызывают сомнений.

Ценность результатов исследования для науки и практики

Результаты исследований нашли практическую реализацию в установлении основных требований к технологическому процессу получения биологически активных веществ из биомассы клеточных культур растений *R. carthamoides*, *P. ginseng*, *E. senticosus*, *D. maculata*, *D. communis*, *S. Divaricata* и напитков профилактической направленности на их основе.

Соискателем Лосевой А.И. разработан и утвержден комплект технической документации (ТУ и ТИ) на густые и сухие растительные экстракты на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro* и функциональных напитков на их основе. Созданы оригинальные технические решения, которые прошли апробацию на предприятиях отрасли. Проведена опытно-промышленная проверка и внедрение готовой продукции в производство.

Техническая новизна разработанных технологических решений подтверждена патентами РФ на изобретение.

Подтверждение апробации основных результатов научного исследования

Основные положения диссертационной работы и результаты исследований получили одобрение на симпозиумах, конгрессах, конференциях, семинарах и совещаниях различного уровня за рубежом и в России, а также опубликованы в открытой печати в более чем 40 печатных работах, в том числе в одной монографии, 8 статьях в журналах, индексируемых в базах цитирования Scopus, Web of Science и RSCI, в 10 статьях журналов, рекомендованных ВАК для публикации основных материалов диссертационных исследований, 2 патентах РФ и 1 заявке на изобретение.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает содержание и основные результаты исследований, изложенных в диссертационной работе.

В порядке дискуссии по диссертационной работе имеются **замечания и рекомендации:**

1. По тексту диссертационной работы автор использует вариации названия растений на двух языках, что затрудняет восприятие информации. Русские и латинские названия растений следовало привести только в начале научной работы. Далее рекомендуется использовать по всему тексту либо только латинский, либо только русский вариант названия на усмотрение автора.

2. Отсутствуют ссылки на библиографические источники. В частности отсутствуют ссылки на Красные книги разных уровней, которые следует указать при описании редких видов растений.

3. В разделе 3.2 диссертационной работы автор приводит результаты анализа методом ТСХ (рисунки 3.2.1, 3.2.8-3.2.12). Представленные в настоящем виде фотографии ТСХ пластинок не являются информативными. Во-первых, в подписях к рисункам не указаны условия проведения

хроматографирования в тонком слое (элюент, длина волны, при которой происходила съемка, дериватизирующий агент, если он использовался). Во-вторых, на рисунках отсутствуют подписи к пятнам. Так, например, на рисунке 3.2.8 не ясно, были ли нанесены разные фракции. И, если да, то чем их отличие (возможно, это были повторности одной фракции).

Также по представленным результатам ТСХ и из текста работы не ясно, использовались ли стандартные вещества при проведении ТСХ. Каким образом осуществлялась идентификация веществ.

4. На странице 130 диссертационной работы (таблица 3.2.3 Расшифровка и интерпретация ЯМР-спектров пяти экистероидов, идентифицированных в подземной части левзеи сафроловидной) некорректно представлены некоторые результаты. Так, например, название таблицы 3.2.3 и второй колонки не соответствуют представленным данным, т.к. в таблице представлены данные результатов не только ЯМР анализа, но и масс-спектрометрии (ESIMSm/z 535 [M + K]⁺ (100); HRESIMSm/z 497.3108 [M + H]⁺ (calcd for C₂₇H₄₅O₈, 497.3102)).

Считается, что для достоверной идентификации вновь выделяемых соединений необходим комплекс из четырех методов: УФ-спектроскопии, ИК-спектроскопии, ЯМР и масс-спектрометрии. Из текста диссертационной работы не понятно, проводился ли анализ образцов методами УФ- и ИК-спектроскопии. Кроме того, не ясно, почему именно для соединений, выделенных из левзеи сафроловидной, представлены данные ЯМР анализа, и проводился ли аналогичный анализ для соединений из других растений.

5. В рукописи диссертации утверждается, что результаты экспериментов показали, что проводить культивирование каллусов исследуемых видов растений на свету не целесообразно, поскольку ростовые параметры в этом случае ниже, чем при культивировании в темноте. Однако данное заключение не имеет статистического обоснования, как и результаты изучения индекса роста каллусных культур, представленные в таблице 4.1.2.

6. В работе не представлены результаты подтверждения трансгенного статуса полученных линий бородатых корней посредством ПЦР анализа и

оценки наличия генов *rolC* и *rolB* в геноме бородатых корней. Данный анализ является ключевым и обязателен для подтверждения трансгенного статуса культур.

7. В названии диссертации указано, что для разработки технологии напитков будут использованы вторичные метаболиты растительного сырья, культивируемого *in vitro*. Вместе с тем автор предлагает технологию с использованием как природного сырья, так и культивируемого *in vitro*, что, на мой взгляд, не нашло должного обоснования в тексте диссертационного исследования.

8. Для полноты диссертационного исследования в него следует включить описание обобщающих данных по сравнительному анализу качественного и количественного состава вторичных метаболитов природного сырья и растительного сырья, культивируемого *in vitro*.

9. В разделе 5.3 диссертационной работы автор приводит результаты изучения антимикробной и антиоксидантной активности растительных экстрактов. Однако автором не обосновано, почему было принято решение о необходимости оценки именно этих видов активности. Также следует отметить, что автор изучил антиоксидантные свойства только по способности улавливать свободные радикалы DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразила). При этом хорошо известно, что использование только одного этого метода не позволяет получить достоверный исследовательский результат. Автору следует расширить перечень оцениваемых биологических свойств экстрактов и изучить также их противодиабетические, противовоспалительные свойства.

Указанные замечания не являются принципиальными. В целом работа выполнена на высоком профессиональном уровне с применением современных методов исследования, методов обработки и анализа полученных результатов.

Заключение

Диссертационная работа Лосевой Анны Ивановны на тему «Теоретическое обоснование и практическая реализация технологий напитков, полученных с использованием вторичных метаболитов растительного сырья, культивируемого

in vitro» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой разработана технология получения напитков, полученных с использованием вторичных метаболитов растительного сырья, культивируемого *in vitro*.

По объему выполненной работы, научной новизне, практической значимости, методическому уровню и инструментальному решению диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 9–14 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции 01.10.2018), а ее автор Лосева Анна Ивановна заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук по специальности 4.3.3. – Пищевые системы и 4.3.5. – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ.

Официальный оппонент

Доктор технических наук, доцент,

Федеральное государственное

автономное образовательное учреждение

высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,

директор научно-образовательного центра «Прикладные биотехнологии»,
236041, г. Калининград, ул. Университетская, д.2,

e-mail: OOBabich@kantiana.ru

Телефон (4012) 59-55-95 доб. 5005



Бабич Ольга Олеговна

Подпись Бабич О.О. заверяю

Начальник управления по работе с персоналом

Федерального государственного автономного

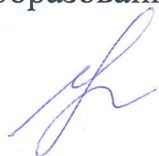
образовательного учреждения высшего образования

«Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

имени Иммануила Канта»



24.09.2018



Улахович Татьяна Олеговна