

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Федоровой Анастасии Михайловны на тему «Получение комплекса биоактивных веществ из клеточных культур *in vitro* *Thymus vulgaris* и *Panax ginseng*: химический состав, биологические свойства и перспективы применения», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

Актуальность темы диссертационной работы

Антиоксидантами являются биологически активные вещества (БАВ), блокирующие реакции свободно-радикального окисления и восстанавливающие окисленные соединения. К антиоксидантам относят аминокислоты, микроэлементы, биофлавоноиды и т.д. Данные вещества восстанавливают и сохраняют здоровье человека, например, во время курения или стресса. Природный механизм антиоксидантов защищает организм от активного кислорода. Также антиоксиданты противостоят старению организма и значительно замедляют его процесс.

Источниками многих антиоксидантов является растительное сырье, произрастающее на территории России. К растениям антиоксидантного действия относят: женьшень настоящий (*Panax ginseng* C.A. Meyer) и тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris* L.). Биоактивные вещества на основе данных трав имеют в своем составе эффективные антиоксиданты, такие как витамины, дубильные вещества, флавоноиды, макро- и микро-элементы, каротиноиды, фенольные соединения и др.

В то же время существует проблема, связанная с исчезновением дикоросов, из-за чрезмерного интереса к их биоактивным веществам. Для того чтобы сохранить их и защитить от исчезновения, необходимо прибегнуть выращиванию растений в искусственных условиях. Технология получения клеточных культур *in vitro* женьшеня настоящего и тимьяна обыкновенного является отличной альтернативой как для сохранения вида, так и для получения вторичных метаболитов с антиоксидантной активностью, такие как гинзенозиды, полисахариды, пептиды, фенольные кислоты, витамины, флавоноиды, а также макро-микроэлементы.

Таким образом, разработка технологии получения комплекса БАВ на основе экстрактов каллусных или корневых культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng* представляет актуальную и востребованную задачу.

Достоверность и научная новизна проведенных исследований

Заключения и предложения, представленные в диссертационной работе, являются подтверждёнными и вытекают из результатов проведенной научно-исследовательской работы.

К основным результатам, имеющим научную новизну можно отнести следующие: проанализировано содержание БАВ в каллусных культурах и культурах генетически модифицированных корней *T. vulgaris* и *P. ginseng* по сравнению с этими же БАВ в традиционном растительном сырье. Установлены рациональные параметры экстрагирования каллусных культур *T. vulgaris* и корневых культур *P. ginseng*. Исследованы антимикробные и антиоксидантные свойства экстрактов культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng* и оценены их физико-химические свойства, показатели безопасности, а также установлен их качественный и количественный состав биоактивных веществ. Подобраны рациональные параметры распылительного высушивания экстрактов клеточных культур *T. vulgaris* и *P. ginseng*. Установлен качественный и количественный состав сухих экстрактов культуры клеток растений *T. vulgaris* и *P. ginseng*. Доказана высокая биологическая активность сухого комплекса БАВ культур клеток *T. vulgaris* и *P. ginseng* на модельных организмах *Saccharomyces cerevisiae*. Предложена принципиальная схема получения сухой смеси комплекса биоактивных веществ культур клеток *T. vulgaris* и *P. ginseng* и экспериментально обоснован компонентный состав сухой смеси комплекса биоактивных веществ каллусных культур *T. vulgaris* (25 %) и корневых культур *in vitro* *P. ginseng* (75 %).

Теоретическая и практическая значимость работы результатов исследований

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в углублении знаний в вопросах получения каллусных культур и культур генетически модифицированных корней растений; установления рациональных параметров экстракции комплекса БАВ из биомассы культур *in vitro*; изучения состава сухих экстрактов культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng* и оценки их биологической активности.

Практическая значимость работы заключается в разработке принципиальной схемы производства сухого комплекса биоактивных веществ клеточных культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*, а также в выявлении возможности применения сухого комплекса биоактивных веществ из клеточных культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*.

Также практическая значимость работы подтверждена заявкой на патент РФ № 2022112230 «Способ получения биологически активной добавки с антиоксидантными свойствами на основе молочной сыворотки и экстрактов *T. vulgaris* и *P. ginseng*». Разработаны и утверждены технические условия и технологическая инструкция по

производству сухого комплекса вторичных метаболитов, выделенных из экстрактов каллусной культуры тимьяна обыкновенного и корневой культуры женьшеня настоящего (ТУ 10.89.19–282–02068309–2022 и ТИ 10.89.19–282–02068309–2022).

Разработанная рецептура сухого комплекса БАВ из экстрактов каллусной культуры тимьяна обыкновенного и культуры генетически модифицированных корней женьшеня настоящего апробирована на промышленных предприятиях: АО «Кемеровская фармацевтическая фабрика» (г. Кемерово) и ООО «С-Фарм» (г. Кемерово).

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Научные положения, выводы и рекомендации, представленные в диссертации, теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены. Соискателем выполнены исследования, которые последовательно решают ряд задач:

- изучение физико-химические показатели растений *T. vulgaris* и *P. ginseng*;
- подбор параметров получения клеточных культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*, изучить их характеристики и свойства;
- исследование процесса экстракции комплекса БАВ из биомассы клеточных культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*, изучить его химический состав и свойства;
- исследование процесса распылительного высушивания экстрактов клеточных культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*, исследовать состав сухих экстрактов, оценить их биологическую активность с применением модельных организмов *Sacharomyces cerevisiae*;
- разработка принципиальной схемы производства сухого комплекса биоактивных веществ клеточных культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*, изучить их химический состав и биологические свойства, установить экономическую эффективность производства;
- апробация и выявление возможности применения комплекса биоактивных веществ из клеточных культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*;
- разработка технической документации на технологию комплекса биоактивных веществ из клеточных культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*.

Для реализации поставленных задач применяли общенаучные и специальные методы исследований.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них: 2 статьи в журналах, индексируемых в международных базах Scopus и Web of Science; 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК; 1 заявка на патент.

Структура диссертационной работы

Представленная на рассмотрение диссертационная работа Федоровой Анастасии Михайловны включает все необходимые для данного вида научных работ разделы: введение, аналитический обзор по теме исследования (глава 1), организация, объекты и методы исследований (глава 2), результаты исследований и их анализ (глава 3), практическая реализация результатов исследования (глава 4), выводы и результаты, приложения. Работа оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями. Характеризуются логичностью и завершенностью исследований. Основное содержание работы изложено на 164 страницах машинописного текста, содержит 48 таблицы, 66 рисунков. Список используемых источников включает 160 наименований.

Автореферат по содержанию, структуре и объему соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии РФ. Материал в автореферате изложен логично и отражает основное содержание диссертационной работы.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» и паспорту научной специальности.

Диссертация Федоровой Анастасии Михайловны, посвящена исследованию и разработке технологии получения сухого комплекса биоактивных веществ на основе экстрактов каллусных и корневых культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*, соответствует п. 13 и 26 паспорта специальности 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ.

По результатам, представленным в каждом разделе диссертационной работы, имеется краткое обсуждение и анализ полученных результатов, сделаны соответствующие выводы. Представленные в заключительном разделе диссертационной работы выводы соответствуют поставленным целям и задачам исследования, научно обоснованы и подтверждены экспериментальными данными, полученными автором.

Анализ и оценка отдельных разделов диссертации, позволяет говорить о том, что последовательность представления материала логична, экспериментальный материал описан и обработан, а так же проиллюстрирован в достаточном количестве.

Диссертация и автореферат по содержанию, структуре и объему соответствуют требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

Вклад соискателя в разработку проблемы

Диссертация является полностью завершённым научным трудом, приводящим результаты собственных исследований соискателя по изучаемой проблеме.

Результаты работы доложены, обсуждены и получили положительную оценку на симпозиумах, конгрессах и конференциях различного уровня.

Автореферат отражает содержание, основные результаты исследований, изложенные в диссертационной работе.

Оценивая работу в целом, следует подчеркнуть, что соискателем выполнена большая экспериментальная работа на хорошем методическом уровне, имеющая научное и прикладное значение. Высокую значимость работе придает использование культур клеток и тканей растений женьшеня настоящего и тимьяна обыкновенного, что является отличной альтернативой как для сохранения вида, так и для получения вторичных метаболитов с антиоксидантной активностью.

Наряду с общей высокой положительной оценкой работы, к ней имеются некоторые **замечания и предложения:**

1. Автором дано не полное латинское название исследуемых объектов. При первом упоминании растения принято давать полное латинское название со ссылкой на автора, например, *Panax ginseng* C.A. Meyer и *Thymus vulgaris* L., а далее, по ходу изложения принято сокращать родовое название растения, например, *P. ginseng* и *T. vulgaris*, что тоже не сделано автором.
2. В работе не указано, входят ли исследуемые виды растений, из которых планируется получать БАВ в фармакопею, а также в какую именно Красную книгу внесен женьшень?
3. При упоминании о корневых культурах автор не указывает, о каких конкретно корневых культурах идет речь? Это адвентивные корни или генетически модифицированные корни (*hairy roots*)? Из текста работы становится ясно, что речь идет о генетически модифицированных корнях. Тогда не понятно, почему не проведен молекулярно-генетический анализ полученных культур? Дело в том, что это могут быть адвентивные корни, контаминированные агробактерией.
4. Автор диссертационной работы не всегда хорошо ориентируется в терминах:
 - Например, термин «клеточная культура» относится к культурам клеток животных. Для культуры клеток растений применимы термины: «культура клеток растений», «каллусная культура», «суспензионная культура» и т.д.
 - Вместо «свободная от гормонов среда» (с. 31) следует употреблять «безгормональная среда», «штамм суперпроизводитель» следует заменить на «штамм суперпродуцент», «неповрежденное растение» на «нативное растение».

- То, что автор называет «цикл выращивания» (с. 50) правильнее назвать «цикл субкультивирования» или «пассаж».
 - На с. 51 говорится о том, что антибиотик вносят в состав питательной среды для «удаления» бактерий, однако в данном случае правильнее сказать для их «элиминации».
 - На с. 53 нет ссылки на формулу, по которой определяли прирост биомассы, который выжали в г или мг. Также не понятно, почему для характеристики роста биомассы применили именно эту формулу, хотя более распространено вычислять индекс роста культуры (I).
5. Табл. 2.3.1 (с. 48) не информативна. Вместо указания концентраций маточных растворов не понятно, какого состава, следовало бы привести компонентный состав питательной среды со ссылкой на источник. Также можно было бы указать, что использовали конкретную питательную среду с некоторыми модификациями автора. Названия «Макросоли» и «микросоли» считается лабораторным жаргоном. Корректнее употреблять термины «макроэлементы» и «микроэлементы».
 6. На с. 48 отсутствуют ссылки на состав питательных сред (МС, В₅, SH) при их первом упоминании.
 7. Не понятно, почему в состав питательных сред вносят 2 % агара, который является одним из самых дорогих компонентов, а не - 0.6-0.7 %, как это принято в отечественных и зарубежных протоколах по культивированию высших растений? Причиной плохой полимеризации может быть либо использование не качественного агара, либо внесение в состав питательной среды сверхчистой сахарозы, либо неправильно подобранные условия стерилизации питательной среды.
 8. На с 73, в названии рис. 3.2.3 зависимость прироста биомассы от продолжительности культивирования называется динамикой роста. Не понятно, почему кривая роста представлена в виде гистограммы, а не графика. Данный рисунок в тексте обсужден слабо. Не указаны основные фазы роста (лаг-фаза, фаза экспоненциального и стационарного роста, а также отмирания). То же самое касается и рис. 3.2.4. (с. 74).

Приведенные замечания и пожелания носят частный характер, не снижают высокого уровня работы в целом и не отражаются на основных положениях, представленных автором к защите.

Заключение

Анализ материалов исследований, выводов и рекомендаций по диссертационной работе Федоровой Анастасии Михайловны на тему «Получение комплекса

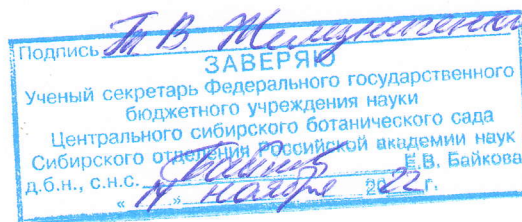
биоактивных веществ из клеточных культур *in vitro* *T. vulgaris* и *P. ginseng*: химический состав, биологические свойства и перспективы применения» дает основание полагать, что она является законченным, самостоятельно выполненным научным исследованием, представляющим логическое единство, посвящена решению важной задачи.

Диссертация отвечает требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013 3 842 (редакция т 28.08.2017), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. По структуре и содержанию, теоретическому уровню, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Федоровой Анастасии Михайловны соответствует установленным критериям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ.

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ:

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии ЦСБС СО РАН, кандидат
биологических наук

Железнеченко Татьяна Витальевна



630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, д. 101.

e-mail: zhelez05@mail.ru, тел: +7-913-756-89-22

Я, Железнеченко Татьяна Витальевна, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета и их дальнейшую обработку.

14.11.22