

В диссертационный совет Д 006.021.02
при ФГБНУ «Федеральный научный
центр пищевых систем им. В.М.
Горбатова» РАН

109316 г. Москва, ул. Талалихина, 26

О Т З Ы В

официального оппонента доктора технических наук, профессора
Гуринович Галины Васильевны на диссертационную работу
Востриковой Натальи Леонидовны на тему «Разработка научно-
практической модели выявления и идентификации ткане- и
видоспецифичных веществ белковой природы в мясной продукции»,
представленную на соискание ученой степени доктора технических
наук по специальности 05.18.04 - Технология мясных, молочных и
рыбных продуктов и холодильных производств, 05.18.07 –
Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ
(технические науки)

Актуальность темы диссертационной работы.

Одной из основных проблем современного производства мясных продуктов является качество мясного сырья, которое зависит от разных факторов, включая генетические составляющие, условия транспортирования, производства и переработки. К наиболее значимым компонентам мяса относятся белки, общее содержание, структура и функциональное состояние которых в составе этой сложной биологической системы, с большим количеством взаимодействующих составляющих, постоянно изменяется. Для изучения межвидовых и внутривидовых особенностей белков мяса, трансформации их в процессе созревания и технологической обработки требуются современные аналитические технологии, основанные на системном подходе к анализу. Широкие возможности в этом направлении открывает протеомика, как методологии изучения белков в определенной системе и в определенное время, позволяющая идентифицировать и устанавливать сложные закономерности между состоянием белков, функционально-технологическими свойствами сырья и способами обработки, разрабатывать точные аналитические методы поиска биомаркеров и выявления

недобросовестных практик. Поэтому внедрение протеомики следует рассматривать как важный шаг на пути достижения более высокого качества сырья и устойчивого развития производства. В свете вышеперечисленного актуальность темы исследования Востриковой Натальи Леонидовны представляется несомненной.

Научная новизна работы. Автором научно обоснована методология подхода к системному анализу совокупных белков мясного сырья, их идентификации на основе протеомной технологии и биоинформатики.

Научно обоснована модель и разработан алгоритм изучения протеома белков сырья, используемого в производстве мясных продуктов.

С использованием разработанного алгоритма получены данные, характеризующие совокупность белков основных видов сельскохозяйственного сырья и птицы, а также регионального сырья, включая конину и верблюжатину, позволяющие идентифицировать видоспецифичные белки с целью использования их в качестве биомаркеров аутентичности мясного сырья.

Впервые при идентификации протеома мышечных белков в многокомпонентной мясной продукции применен прием коэлектрофореза, позволивший разделить типичные видовые белки животных и птицы с одинаковой молекулярной массой.

Установлены специфические биомаркеры мышечной ткани в термообработанной мясной продукции, позволяющие с высокой степенью достоверности контролировать количественное содержание мясных ингредиентов в составе мясной продукции, подвергнутой термообработке, вызывающей деградацию белков, что затрудняет их идентификацию другими современными методами, в том числе на основе анализа ДНК. Полученные результаты имеют большое значение в практике определения оригинальности мясных продуктов.

Большое научно-практическое значение имеет создание программного комплекса «Протеомные карты мяса и мясных продуктов».

Получены новые данные, характеризующие белковый профиль свинины разных групп качества, установлены биомаркеры для идентификации сырья с пороками автолиза.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретический вклад выполненных исследований заключается в развитии и систематизации научных исследований по изучению биохимических механизмов, как факторов формирования качества мясного сырья, в том числе с учетом характера автолиза и условий созревания, а также установлению аутентичности мясной продукции на базе комплекса методов по выявлению, изучению и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы животного происхождения.

Автором существенно расширены представления об отличительных особенностях белкового состава мяса традиционных видов сельскохозяйственных животных и птицы, а также регионального сырья, включая количественную и качественную оценку содержания индивидуальных белков, в том числе используемых в качестве биомаркеров при решении научных и прикладных задач. Систематизированные данные архивированы с созданием специализированного информационного ресурса – атласа «Протеомные карты мяса и мясных продуктов», позволяющих оптимизировать процесс выявления аутентичности мясного сырья и продукции.

Практическую значимость работу составляет модификация классических подходов электрофоретического разделения белков мясного сырья и пробоподготовки для повышения их разрешающей способности и потенциала в изучении нативных и денатурированных белков, разработка новой методологии количественной идентификации мышечного белка при помощи метода мониторинга множественной реакции (MRM-метода), что подтверждено патентами на изобретения,

Практические аспекты применения разработанных методологий использованы в рамках работ по грантам различных ведомств (Грант РФФИ, Грант РНФ).

Результаты исследований апробированы в 3 исследовательских и 5 производственных лабораториях. Разработан практический курс для слушателей повышения квалификации химиков производственных лабораторий, а также лекции «Методы контроля качества мясной продукции» для студентов, бакалавров и магистрантов ВУЗов и обучающая программа дополнительного профессионального образования по теме «Выявление фальсификации состава продуктов молекулярно-генетическими методами» на учебном портале eНано.

Разработанные методы легли в основу ГОСТ 33692-2015 Белки животные соединительнотканые. Общие технические условия.

Выполненные Востриковой Н.Л. исследования имеют реальное теоретическое и практическое значение для соответствующей отрасли науки и предприятий, производящих продукцию, государственных органов контроля и надзора, аккредитованных лабораторий.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций обеспечивается теоретико-методологической базой и большим объемом выполненных исследований с использованием современных фундаментальных методов и лабораторного оборудования, а также корректностью обработки полученных экспериментальных результатов и положительной реализацией разработок на объектах, полученных в условиях производства. Результаты, полученные на разных этапах исследования, взаимосвязаны и непротиворечивы.

Необходимо обратить внимание на использование обширной базы научных данных и программного обеспечения при анализе результатов собственных исследований, что позволило соискателю делать обоснованные выводы относительно возможности протеомных технологий в исследовании мышечных белков мясного сырья разных видов, качества и аутентичности мяса и мясной продукции.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является результатом обобщения исследований, которые непосредственно проводились

автором с 2012 г. Личный вклад состоит в анализе научно-технической информации по теме исследований, формировании исследовательской проблемы и обосновании подходов к ее решению, формированию плана исследований, выполнении теоретических и экспериментальных исследований, анализе, систематизации и обработке их результатов.

По материалам диссертации опубликовано 57 научных работ, в том числе одна монография, одно учебное пособие, 20 статей входящих в перечень ВАК Министерства образования и науки РФ, 6 статей в изданиях, рецензируемых в международных базах данных (Scopus и WoS).

Основные результаты работы доложены и представлены на международных и всероссийских научных, научно-практических конференциях, форумах, симпозиумах, в том числе, 55-ом, 58-ом, 59-ом, 61-ом и 63-ем International Congress of Meat Science and Technology (Копенгаген, Дания 2009; Торонто, Канада, 2012; Измир, Турция, 2013; Клермон Ферран, Франция, 2015; Корк, Ирландия, 2017 гг.).

Результаты интеллектуальной деятельности, полученные в ходе диссертационного исследования, зарегистрированы в виде 4 патентов.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» Анализ и оценка отдельных разделов диссертации, позволяет говорить о том, что последовательность изложения материала логична, работа написана с использованием специальной терминологии, экспериментальный материал проиллюстрирован. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав теоретических и экспериментальных исследований и выводов. Основной текст работы изложен на 218 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц, 70 рисунков, 12 приложений, библиографический список включает 269 работ отечественных и зарубежных авторов.

Автореферат включает 45 страниц, достаточно полно отражает содержание работы, содержание которой, в свою очередь, достаточно полно представлено в публикациях автора.

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

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, отражены выносимые на защиту научные положения, научная новизна и практическая значимость, приведены сведения об апробации результатов работы.

В первой главе представлен обзор современных методов экспертизы и идентификации состава мясных продуктов, возможностей методов протеомики и биоинформатики в развитии лабораторной базы; на основе анализа теоретических исследований и практических разработок раскрыты перспективы протеомных технологий в исследованиях биохимических механизмов формирования качества мясного сырья и продуктов, сформулирована научная концепция работы.

Во второй главе диссертации приведена методология проведения эксперимента, организация опытов, описание объектов исследования. Выбор методов исследований и условий экспериментов показывает понимание автором сущности исследуемых процессов, позволяет решать поставленные в работе цель и задачи исследований.

Достоинством работы является использование широкого спектра современных инструментальных биоаналитических методов исследования, информационных технологий для визуализации, обработки, анализа данных исследований и рекомендаций по их применению при решении прикладных задач отрасли.

В третьей главе представлены результаты исследований по модификации отдельных этапов протеомного исследования белков мяса как сложной биологической системы, в части их извлечения, разделения и детекции, что оказывает существенное влияние на возможности, разрешающую способность анализа и конечный результат.

По результатам исследований оптимизированы условия экстракции и префракционирования белков, что позволяет выполнять анализ, как исходного сырья, так и продукции, подвергнутой термической обработке.

Представлены результаты исследований по оптимизации условий разделения основных белков мяса с молекулярной массой до 200 кДа и рН изоэлектрической точкой от 4,85 до 10,0, по оценке эффективности разных методов детекции белков для выявления их максимального числа, в том числе содержащихся в исследуемой совокупности в небольшом количестве. Приведены данные, доказывающие возможность применения разработанного подхода для установления видо- и тканеспецифичных белков мясного сырья.

Полученные результаты являются научно-практической основой стратегии исследования протеома мяса и мясной продукции.

В четвертой главе представлены результаты реализации разработанной методологии исследования белкового состава скелетных мышц скота и птицы. Экспериментальные результаты включают 2D-электрофореграммы белков, протеомные карты свинины, говядины, конины, верблюжатины, а также мяса курицы и индейки. Методом MALDI-TOF масс-спектропии идентифицирована большая часть белков, выделенных из основного сырья мясной промышленности. Выполненные исследования впервые позволили представить наиболее полную информацию о составе белков мяса разных видов животных и птицы, включая не только главные белки сократительной системы и саркоплазматические, но и белки гликолитического цикла, метаболические, стрессовые.

Представлены результаты разделения белков методом коэлектрофореза, доказывающие возможность применения предлагаемой методологии для анализа смесей белков, выделенных из различных видов мясного сырья, установлены биомаркеры видоспецифичности мясного сырья. В развитие рассматриваемой концепции представлены результаты исследования белковых профилей мышц свинины окислительного и гликолитического типа.

Представлены результаты протеомной идентификации белковых профилей свинины с пороками автолиза в сравнении с сырьем нормального качества, выявлены биомаркеры, позволяющие оценить особенности развития процесса созревания сырья с различными функциональными свойствами, и пептидный профиль свинины разного характера автолиза при созревании.

Заслуживают внимания результаты протеомной идентификации изменений белков говядины, созревание которой в течение разного времени (2 суток, 4 суток, 7 суток) проходило в анаэробных условиях.

Полученные данные являются основой для понимания биохимических механизмов формирования качества мясного сырья и управления ими.

В пятой главе приведены результаты исследований по выявлению биомаркеров для определения аутентичности состава мясных продуктов на основе анализа белковых профилей мясного сырья и немясных ингредиентов рецептуры. Исследования выполнены применительно к вареным колбасным изделиям, в частности, к колбасе «Докторская» и «Любительская традиционная» с растительными белковыми компонентами. Полученные результаты являются доказательством эффективности применения протеомных технологий для выявления неспецифических белков, а также контроля соотношения ингредиентов в рецептуре.

Приведен алгоритм идентификации видоспецифичных белков мясного сырья убойных сельскохозяйственных животных и птицы.

Представлена процедура интерпретации полученных результатов с использованием биоинформатики, позволяющей количественно идентифицировать биомаркеры в составе мясных продуктов. Результатом этой работы явился программный комплекс «Протеомные карты мяса и мясных продуктов».

В шестой главе приведены результаты научно-производственной апробации результатов и оценки экономической эффективности применяемых методов.

В целом, результаты работы, выполненной Востриковой Н.Л., отвечают поставленной цели и задачам исследований и сделанные выводы непосредственно вытекают из полученных данных, что позволяет считать их хорошо обоснованными. Диссертационная работа оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями, характеризуется логичностью и завершенностью исследований.

Замечания по тексту диссертации и автореферату. Замечания и рекомендации к диссертационной работе сводятся к следующим.

1. Автором получены и представлены 2Д-электрофореграммы белков свинины нормального качества и с пороками PSE и DFD на разных стадиях автолиза. Вместе с тем, данные идентификации белков приведены безотносительно принадлежности сырья к одной из групп качества (таблица 4.3). При анализе экспериментальных данных представляется целесообразным оценить соотношение скелетных, метаболических, стрессовых белков в белковом профиле свинины разного качества.

2. Изменение белков и пептидного профиля свинины разных групп качества в процессе автолиза автор связывает, в том числе, с активностью собственных протеолитических ферментов. В этой связи желательно было бы привести результаты определения физико-химических показателей, подтверждающих это заключение, в частности количество общего, небелкового азота и азота полипептидов, а также отдельных фракций белков.

3. Несомненный интерес представляют данные динамики белкового профиля мяса при созревании в автолизе, первая стадия которого проходила в анаэробных условиях. При постановке эксперимента автор в параллельных сериях варьировал как общую продолжительность созревания, так и продолжительность анаэробной и аэробной стадий. Считаю методически более верным регламентацию условий эксперимента за счет сокращения числа переменных, что позволит получить более корректные данные, а именно одинаковая продолжительность созревания сырья в аэробных или анаэробных условиях. Следует также уточнить, в связи с чем исследования выполнены на

образцах говядины, в то время как исследования динамики белков сырья аномального качества на свинине.

4 Следует указать на недостаточную информативность работы в части описания объектов исследования применительно к автолизу (глава 4, п.4.2), а именно автором не указано, на основании каких показателей устанавливалась принадлежность сырья к группе качества, а также динамика этих показателей в процессе созревания сырья.

5 Некорректно представлен рисунок, характеризующий отличия морфологии мышечного волокна свинины разных групп качества. Из рисунка не следуют декларируемые отличия в диаметре мышечного волокна и в содержании волокон разного типа (рис. 4.23 с. 152).

6 Применительно к методике выявления типичных для колбасных изделий видоспецифичных белков животного происхождения следовало указать точность метода, то есть минимально определяемый уровень содержания мясного компонента в рецептуре.

7 Апробация методологии относительно продукции показана только на группе вареных колбас, целесообразно провести её на более широком перечне продукции.

В качестве пожеланий для дальнейшего развития работы считаю необходимым отметить, следующее:

- целесообразно рассмотреть влияние пород и системы откорма на экспрессию белков;
- для получения более объективной информации, которую можно применить в лабораторной практике контролирующих организаций, желательно сформировать паспорта основных групп мясных продуктов, выработанных по рецептурам стандартов (ГОСТ) при помощи алгоритмов и подходов, представленных в работе.

Заключение о соответствии диссертации критериям положения о присуждении ученой степени доктора наук (технические науки).

Сделанные по работе замечания не отражаются на основных положениях, предложенных автором к защите. Анализ материалов исследований, выводов и рекомендаций по диссертационной работе Востриковой Натальи Леонидовны «Разработка научно-практической модели выявления и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы в мясной продукции» дает основание полагать, что она является законченным самостоятельно выполненным научным исследованием, представляющим логичное единство, посвященным решению важной социально-экономической задачи – обеспечение населения качественной и безопасной продукцией, в условиях реализации Стратегии научно-технологического развития России.

Диссертационная работа отвечает требованиям п.п. 9,10,11,13 и 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (редакция от 28.08.2017 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. По структуре и содержанию, теоретическому уровню, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Востриковой Натальи Леонидовны соответствует установленным критериям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени доктора технических наук по специальности 05.18.04 – «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств», 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ.

Заведующий кафедрой «Технология продуктов питания животного происхождения»
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет», КемГУ
доктор технических наук, профессор

650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
e-mail: gg55@yandex.ru,
телефон 8-906-935-26-20

«25» 09 2019 г.

