

В диссертационный совет 99.0.092.02
на базе ФГАНУ «Всероссийский
научно-исследовательский институт
молочной промышленности»,
ФГБОУ ВО «Российский
биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)»
125080, г. Москва, Волоколамское
шоссе, д. 11, корп. А

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук, заведующего лабораторией молекулярной генетики сельскохозяйственных животных, ведущего научного сотрудника ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» Гладырь Елены Александровны на диссертационную работу Хана Алексея Владимировича на тему «Разработка молекулярно-генетического метода идентификации ДНК *Bos taurus* в молоке и молочных продуктах», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальностям 4.3.3 – Пищевые системы и 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

Актуальность темы диссертации Хана Алексея Владимировича посвящена решению проблемы идентификации видового состава молочных продуктов для контроля их подлинности и биобезопасности. На фоне роста спроса на продукцию из козьего молока отмечается практика видовой фальсификации путём замены или частичной подмены коровьим молоком. При этом наличие даже следовых количеств коровьего молока может нанести вред здоровью потребителей с непереносимостью к данным молочным компонентам. К настоящему моменту аллергия на белки коровьего молока остаётся одной из значимых проблем в медицине. Традиционные методы анализа (хроматографические, иммунологические и др.) не всегда позволяют надёжно идентифицировать видовую принадлежность компонентов молока и молочных продуктов, в особенности после их термической обработки. Применение методов ПЦР в реальном времени

обеспечивает высокую чувствительность, воспроизводимость и точность молекулярно-биологического анализа. В связи с этим, выбранное направление диссертационного исследования Хана Алексея Владимировича является перспективным в области мониторинга качества производимой продукции животноводства.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, заключений и выводов, сформулированных в диссертации

Ханом Алексеем Владимировичем проведён большой объём теоретических и экспериментальных исследований с использованием современных аналитических и молекулярно-генетических методов, основанных на последних достижениях фундаментальной и прикладной науки в области молекулярной биологии, генетики и пищевых систем.

Применение мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с использованием зондов TaqMan обеспечивает одновременное определение нескольких мишеней в одной пробирке за счёт использования зондов с разными флуорофорами (например, FAM, HEX, Cy5) и высокую чувствительность метода при анализе ДНК, выделенной из молочных матриц.

Научные положения и выводы обоснованы многократным проведением молекулярно-генетических испытаний со стандартными, опытными модельными и промышленными образцами козьего и коровьего молока и продуктов на их основе. В соответствии с требованиями нормативных документов проведён анализ ключевых характеристик разработанного метода, включая сходимость и воспроизводимость результатов, а также стабильность набора реагентов. Исследование подтвердило соответствие вышеописанных параметров установленным требованиям. Достоверность полученных результатов обусловлено использованием поверенного аналитического лабораторного оборудования, соблюдением методических рекомендаций, протоколов и действующих стандартов. Диссертационная работа Хана Алексея Владимировича может служить основой для исследований в области идентификации и контроля видового происхождения и безопасности молока и молочной продукции.

Научная новизна исследований и полученных результатов.

заключается в следующем:

Автором впервые проведена комплексная оценка эффективности различных протоколов экстракции ДНК из образцов козьего молока и продуктов на его основе с разной степенью термической обработки.

Разработана методика количественного определения ДНК *Bos taurus* в молочных матрицах на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени и определены ее ключевые метрологические характеристики.

Разработаны специфические олигонуклеотиды, обеспечивающие одновременную детекцию флуоресцентных сигналов при амплификации молекулярных мишеней мтДНК *Bos taurus* и *Capra hircus*, и плазмидного вектора pAL2-T.

Установлено, что разработанный комплект реагентов обладает высокой устойчивостью к перепадам температурных режимов с коэффициентом вариации пороговых циклов, не превышающих 10% между 1 и 10 циклами замораживания-оттаивания.

Теоретическая и практическая значимость

Разработанный молекулярно-генетический метод может использоваться для мониторинга качества и видовой идентификации на предприятиях, специализирующихся на выпуске продуктов из козьего и коровьего молока, а также в испытательных лабораториях, осуществляющих экспертизу на предмет фальсификации продукции. Метод молекулярной диагностики позволяет выявлять следовые количества ДНК *Bos taurus* в молочной продукции, прошедшей различную термическую и технологическую обработку, что делает его пригодным для анализа не только сырья, но и готовых продуктов, таких как йогурт, сыр и сухое молоко. Разработанная методика позволяет определять видовой состав козьего и коровьего молока и продуктов на их основе, обеспечивая контроль состава и подлинности. Внедрение стандарта организации (СТО) подтверждает прикладную значимость результатов диссертационной работы Хана Алексея Владимировича.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертация Хан Алексея Владимировича состоит из введения, трёх глав, выводов, списка литературы, перечня сокращений и приложений. В диссертационной работе представлено 68 рисунков, 24 таблицы, 222 источника литературы, в т.ч. 103 работы опубликованы в период 2020-2025 гг., 149 на иностранном языке, и 3 приложения. Во введении обоснована актуальность темы, научная новизна, практическая

значимость работы, сформулированы цель и задачи диссертационного исследования.

В обзоре отечественной и зарубежной литературы систематизированы данные о физико-химическом составе молока различных видов домашнего скота, приведены результаты анализа современного состояния рынка продуктов из козьего и коровьего молока. Обзор охватывает как исторические аспекты проблемы, так и современные технологические решения. Рассмотрены принципы классификации видов фальсификации пищевых продуктов. Проанализированы традиционные и молекулярно-генетические методы, а также существующие коммерческие наборы для определения молочных и немолочных компонентов в пищевой продукции.

В методологической главе подробно описаны объекты и методы исследования, протоколы приготовления молочных продуктов, пробоподготовка образцов биоматериала и пищевых продуктов. Рассмотрены методы выделения образцов ДНК и измерения их качественных и количественных параметров, описаны программы термоциклирования при проведении ПЦР-анализов и алгоритмы интерпретации полученных данных.

Третья глава включает результаты экспериментальных исследований. Особого внимания заслуживает комплексный подход к оценке пригодности различных способов получения высокоочищенных препаратов ДНК. Выполнен биоинформатический анализ молекулярных маркеров, пригодных для последующей разработки праймеров и зондов TaqMan. Проведено моделирование бинарных молочных смесей путем имитации фальсификации козьего молока-сырья коровьим. Определены ключевые метрологические параметры предложенного молекулярного метода с использованием разработанного набора реагентов. Произведена оценка экономической эффективности и себестоимость молекулярно-биологического анализа. Приведены результаты анализа промышленных продуктов переработки коровьего и козьего молока с использованием комплекта разработанных олигонуклеотидов. Подробно описана разработка методики испытаний для определения ДНК жвачных в молоке и молочной продукции. Представленные данные проиллюстрированы графиками и таблицами, способствующими лучшему восприятию результатов. В выводах последовательно обобщены основные положения, подтверждающие достижение поставленной цели и решение всех

сформулированных задач.

Полнота опубликования основных положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты диссертационного исследования опубликованы в 15 научных публикациях, включая 6 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи в журналах РИНЦ и 7 публикаций в сборниках материалов научных конференций. Публикации в сборниках международных и российских конференций включают стендовые доклады и выступления с устными презентациями.

Характеристика автореферата диссертации

Автореферат по своей структуре соответствует структуре диссертации. Выводы, сформулированные в автореферате, соответствуют основным выводам, полученным в диссертационной работе.

Замечания и пожелания по диссертации

При ознакомлении с диссертационной работой возник ряд вопросов и замечаний:

1. Будет ли расширяться база олигонуклеотидных праймеров и зондов, предназначенных для анализа продуктов, выработанных из молока других видов сельскохозяйственных животных?
2. В работе использовались различные коммерческие наборы, произведенные в России для выделения ДНК. Почему только данные 5 наборов, чем обусловлен их выбор?
3. Какие основные критические факторы могут повлиять на определение видовой принадлежности к *Bos taurus* и *Capra hircus* продуктов, предложенным диссертантом молекулярно-генетическим методом?
4. Чем обусловлен выбор генов 16S рРНК и D-петли в качестве молекулярных мишеней при оценке подлинности молока?

При этом указанные замечания не снижают научной и практической ценности диссертационной работы, и носят дискуссионный характер.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней

Диссертационная работа Хана Алексея Владимировича на тему: «Разработка молекулярно-генетического метода идентификации ДНК *Bos taurus* в молоке и молочных продуктах» является завершенной научно-квалификационной работой, решающей актуальную задачу в

области обеспечения контроля качества и подлинности молока и молочных продуктов. Диссертация соответствует всем критериям п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Хан Алексей Владимирович, достоин присуждения учёной степени кандидата технических наук по специальностям 4.3.3 – «Пищевые системы» и 4.3.5 – «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ».

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук по специальности 03.00.23 – Биотехнология, заведующий лабораторией молекулярной генетики сельскохозяйственных животных, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»



Елена Александровна Гладырь

Организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста)
Адрес: 142132, Московская обл., г.о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60
Телефон: 8(4967)651104
e-mail: elenagladyr@mail.ru

Подпись вед. научн. сотр., канд. биол. наук
Гладырь Е.А., заверяю _____ / И.В. Гусев
заместитель директора по общим вопросам, канд. биол. наук ФГБНУ ФИЦ
ВИЖ им. Л.К. Эрнста



16.05.2025

Я, Гладырь Елена Александровна, даю согласие на включение моих персональных данных в документы, связанные с защитой диссертации Хана Алексея Владимировича, и их дальнейшую обработку.