

Отзыв

официального оппонента, доктора технических наук Симоненко Сергея Владимировича на диссертационную работу Хан 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 специальности 4.3.3 Пищевые системы и специальности 4.3.5 Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ.

Актуальность темы исследования.

В Российской Федерации обеспечение населения безопасными и качественными пищевыми продуктами является приоритетным направлением сохранения здоровья нации. На правительственном и международном уровне проводятся меры по надзору и мониторингу продовольственных продуктов с целью определения исходного состава сырья и проверки наличия различных добавок. Однако, в соответствии с официальными данными, доля фальсифицированной молочной продукции на прилавках магазинов составляет около 26-30% в год.

На сегодняшний день широкое распространение получила подмена более дорогостоящего козьего и овечьего молока менее ценным и более доступным коровьим молоком. Основными причинами подобного вида фальсификации являются низкое производство молока, полученного от мелкого рогатого скота, рост потребительского спроса и другие экономические аспекты, которые приводят к существенной разнице в стоимости между указанными видами молочной продукции. Однако важно отметить, что видовая подмена молока несет угрозу здоровью потребителей в связи с потенциальным риском возникновения аллергии. В связи с этим, целесообразно проводить идентификацию видов молока надежными методами.

На основании сказанного выше диссертационное исследование Хан А.В., направленное на разработку молекулярно-генетического метода

идентификации ДНК *Bos taurus* в молоке и молочных продуктах является актуальной задачей.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации достаточно высокая, что подтверждается анализом и систематизацией большого объема информации по теме идентификации ДНК *Bos taurus*, применением современных приборов и методов анализа и статистической обработки полученных результатов. Соискателем получен и проанализирован значительный объем экспериментальных данных, результаты которых соответствуют выводам, сформулированным в диссертации. Основные положения работы в достаточной степени апробированы, обсуждены в научном сообществе, разработанный метод проверен в реальных условиях ИЛ «Молоко» (ФГАНУ «ВНИМИ»), ФГБУ «ВГНКИ», ВНИИТеК.

Тема и содержание работы соответствует паспорту специальности 4.3 3. Пищевые системы и специальности 4.3.5 Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ.

Достоверность и новизна исследований и полученных результатов

Использованные методы исследования, кратность проведенных опытов и обработка полученных данных подтверждают достоверность полученных результатов.

Научная новизна работы заключается в обосновании использования постгеномных технологий для мониторинга молочного сырья и подтверждения состава козьего молока и продуктов его переработки, возможности эффективной амплификации фрагментов ДНК коровы, выделенной из молочной продукции, в диапазоне от 0,001 нг до 10 нг на реакцию. К новым результатам следует отнести разработанные олигонуклеотидные праймеры и зонды, обеспечивающие амплификацию видоспецифичных фрагментов мтДНК жвачных и ДНК вектора pAL2-T.

Оценка объема, структуры и содержания работы

Диссертационная работа и автореферат Хан А.В. оформлены в соответствии с требованиями ВАК РФ. Работа имеет стандартную структуру и состоит из введения, обзора научной литературы (глава 1), методологии исследований (глава 2), экспериментальной части (глава 3), выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, приложений. По объему, содержанию и выводам представляет законченное исследование с последовательными и логичными выводами.

Диссертация изложена на 156 страницах, содержит 24 таблицы, 68 рисунков, 3 приложения. В список литературы входит 222 источников, из которых 149 зарубежных источников.

Во введении автором обоснована актуальность исследований, сформулированы цели и задачи исследований, определена научная новизна и практическая значимость полученных результатов, предоставлена информация о проведенных испытаниях и научных публикациях.

Первая глава посвящена обзору научно-технической литературы по общим и сравнительным видовым характеристикам молока крупного и мелкого рогатого скота, современным тенденциям и перспективам развития мирового и российского рынков молочной продукции, приведены сведения о видах фальсификации молочной продукции и вызываемых ею рисках для здоровья. Проведен обзор существующих методов выявления различных примесей и подмены молока разных видов жвачных животных.

Вторая глава содержит перечень объектов и методов исследования, а также схему проведения планируемого исследования.

В третьей главе представлены экспериментальные исследования. На первом этапе диссертантом проведен сравнительный анализ эффективности методов экстракции ДНК из козьего молока и продуктов его переработки с использованием коммерческих наборов для выделения нуклеиновых кислот.

На основании проведенных исследований установлено, что при работе с молочными матрицами сорбционные методы экстракции ДНК обладают рядом преимуществ, по сравнению с методом высаливания, а также позволяют

получать высокомолекулярные препараты нуклеиновых кислот. Применение методов экстракции на основе сорбентов позволяет исключить эффект ингибирования и появление ложноотрицательных результатов ПЦР, что играет ключевую роль при определении происхождения продукции из козьего молока.

В разделе 3.2. «Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей ДНК *Bos taurus*, *Capra hircus* и вектора pAL2-T» в рамках исследования был разработан дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов, обеспечивающих одновременную амплификацию участков ДНК коровы, козы и ВКО. Разработанная панель олигонуклеотидов обладает высокой эффективностью, что делает их пригодными для использования в мультиплексной ПЦР-РВ в диагностике *in vitro*, контроле качества молочной продукции, а также в других областях молекулярной биологии и генетики.

В разделе 3.3 диссертации представлены результаты молекулярно-генетического анализа лабораторных молочных матриц методами ПЦР (с использованием симплексной и мультиплексной ПЦР, прямой ПЦР), определена чувствительность выявления ССК коровы относительно ССК козы в молоке методом ПЦР-РВ с SYBR Green.

Результаты исследования подтверждают эффективность использования ПЦР-анализа для видовой идентификации молочной продукции. Однако, для обнаружения незначительных примесей молока другого вида в продуктах высокой температурной обработки требуется оптимизация методики и разработка олигонуклеотидов, направленных на амплификацию более коротких фрагментов ДНК. Установлено, что метод прямой ПЦР позволяет проводить идентификацию состава молока-сырья и упрощает проведение молекулярно-генетического анализа. В результате экспериментальных исследований установлено, что методом ПЦР-РВ с SYBR Green и праймерами BT-F и BT-R можно выявить 1% ССК коровы в сыром козьем молоке.

В разделе 3.4. диссертации «Разработка молекулярно-генетического метода на основе мультиплексной ПЦР-РВ» представлены результаты

исследований по определению ряда ключевых метрологических характеристик метода одновременной амплификации мтДНК *Bos taurus* и *Capra hircus*, используемого для выявления фальсификации козьего молока и полученных из него продуктов переработки; по определению метрологических характеристик метода одновременной амплификации ДНК *Bos taurus* и ВКО.

В рамках экспериментальных исследований был разработан молекулярно-генетический метод с использованием ВКО. В качестве ВКО был выбран плазмидный вектор pAL2-T. Разработанный молекулярно-генетический метод позволяет проводить мультиплексный ПЦР-РВ анализ с использованием технологии TaqMan для определения коровьей ДНК в молоке и продуктах на его основе, обладает высокой чувствительностью, надежностью и стабильностью. Проведена оценка экономической эффективности разработанного молекулярно-генетического метода.

В разделе 3.5 представлены результаты по разработке метода определения содержания коровьей ДНК в молочной продукции методом ПЦР-РВ. Полученные результаты исследований позволили разработать стандарт организации СТО 00419785-083-2025 «Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения ДНК *Bos taurus* в сырье и готовой продукции с использованием технологии TaqMan».

В разделе 3.6 представлены результаты по молекулярно-генетическому анализу промышленных молочных продуктов. Молекулярно-генетическое тестирование образцов проводилось методом симплексной ПЦР. Разработанный метод количественного определения ДНК *Bos taurus* позволяет проводить видовую идентификацию козьего и коровьего молока и продуктов на их основе. Кроме того, данный молекулярно-генетический метод может быть использован для выявления видовой фальсификации в молочной промышленности.

Выводы отражают результаты исследований в соответствии с поставленными задачами.

В приложениях к диссертации приведены материалы, подтверждающие апробацию и практическую значимость полученных результатов выполненных исследований.

Материалы, представленные в автореферате, в полной мере отражают основные разделы диссертационной работы.

Практическая значимость диссертационной работы состоит в разработке олигонуклеотидных праймеров и зондов, обеспечивающих амплификацию видоспецифичных фрагментов мтДНК жвачных и ДНК вектора pAL2-T, разработке молекулярно-генетического метода идентификации ДНК *Bos taurus* в молоке и молочных продуктах и технической документации СТО 00419785-0832025 «Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения ДНК *Bos taurus* в сырье и готовой продукции с использованием технологии TaqMan».

Апробация работы.

Результаты проведенных исследований по теме диссертационной работы были доложены и обсуждены на 5 научных конференциях (2023г, 2024г.). По результатам работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе: 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 9 статей в сборниках трудов конференций и журналах РИНЦ

Замечания, вопросы и рекомендации по диссертации:

1. По всему тексту диссертации и автореферата:

- коровьей ДНК, ДНК коровы, ДНК *Bos taurus*, ДНК домашнего быка;
- ДНК козы, ДНК *Capra hircus*, козьей ДНК, ДНК из козьего молока.

Целесообразно привести к одному виду

2. Глава 1 таблица 1.1 (стр. 11) Показатели казеин, лактоза – единица измерения указана 100 мл/г, а Показатели кальция, фосфор - 100 мл/мг.

3. Глава 1 стр. 35. В таблице 1.5 представлены основные производители наборов реагентов для проведения видовой идентификации. Тест-система «Эврика» для количественного определения ДНК коровы в продовольственном сырье, кормах и пищевых продуктах методом ПЦР-РВ. Хотелось бы уточнить в

чем принципиальное отличие существующей тест-системы и разработанной диссертантом?

4. Глава 1 стр. 45 в таблице 2.1 не указана T_a , °C, а в автореферате на стр. 8 таблица 1, указаны значения T_a , °C. Уточните, чем обосновано разное значение температуры?

5. Глава 2 стр. 42 не совсем понятно, почему пастеризацию молока проводили при температуре (90 ± 2) °C в течение 5 минут. В технологии молока и молочных продуктов приняты другие режимы пастеризации.

6. Глава 3 стр. 50 указано, что содержание ССК в коровьем и козьем молоке не должно превышать 400 тыс/мм³ и 1000 тыс/мм³ соответственно. Соматические клетки нормируются не в мм³, а в см³. Далее по тексту: «...составляли в коровьем молоке $362,67 \pm 29,54$ тыс/мм³, в козьем $835,67 \pm 27,15$ тыс/мм³. Эти значения некорректны, так как учитываются целые клетки и число должно быть кратно 1.

7. На рисунках 3.9, 3.11, 3.13, 3.24, 3.29, 3.31, 3.33, 3.35, 3.37, 3.39, 3.41, 3.43 диссертации и рисунках 10, 12, 14 автореферата нет обозначения осей графиков.

8. На рисунках 3.28, 3.30, 3.40 значения флуоресценции имеют отрицательное значение. Поясните, с чем это связано? Как значение концентрации может быть со знаком минус?

9. Из главы 3 не совсем понятно, чем обоснован выбор такого перечня промышленных молочных продуктов для исследований?

Закключение

Высказанные замечания не снижают общей положительной оценки диссертационного исследования. По актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа «Разработка молекулярно-генетического метода идентификации ДНК *Bos taurus* в молоке и молочных продуктах» Хан А.В, представленная на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 4.3.3. Пищевые системы и 4.3.5 Биотехнология продуктов питания и биологически активных

веществ является законченной научно квалификационной работой, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 4.3.3 и специальности 4.3.5.

Директор НИИ детского питания-
филиала ФГБУН ФИЦ питания и
биотехнологии, доктор технических
наук по научной специальности 05.18.04
- технология мясных, молочных и
рыбных продуктов и холодильных
производств

143500, Московская область, г. Истра,
улица Московская, дом 48,
+7 (498) 3130396,
e-mail: info@niidp.ru

Подпись руки С.В. Симоненко удостоверено:

Специалист по кадрам 1 категории

 С.В. Симоненко

дата



Озерова Е. Г.

21.05.2025г.