

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Облапа Руслана Васильовича «Методологія молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції», подану на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Харчова якість та безпечність сільськогосподарської сировини для виробництва продуктів харчування є однією з головних безпекових компонент кожної держави. Ця компонента є важливим фактором економіки та визначається здатністю країни ефективно контролювати виробництво та проводити ефективний контроль якості продукції харчового призначення. Якісний контроль та моніторинг якості сільськогосподарської сировини та харчової продукції потребує застосування сучасних та відповідних аналітичних методів та діагностичних тест-систем. Таким чином розробка сучасних високоефективних методологічних підходів оцінки показників безпечності та якості продуктів харчування є надзвичайно важливим.

За допомогою молекулярно-генетичних методів аналізу можна успішно ідентифікувати видовий складу м'ясних продуктів, присутність харчових алергенів тваринного і рослинного походження, генетично модифікованої компоненти. Відкриття та розвиток методик діагностики на основі ПЛР дозволило зменшити витрати на аналізи такого типу, час, кількість обслуговуючого персоналу. Незважаючи на значний прогрес у розвитку молекулярно-генетичних методів аналізу та діагностики залишається ще низка проблемних питань які потребують вирішення. Головними проблемними

питаннями молекулярно-генетичного аналізу є стандартизація виконання процедур, мінімізації помилок, високий ступінь відтворюваності та максимальної порівнянності результатів досліджень, висока ефективність протікання ферментативних реакцій.

Таким чином теоретичне обґрунтування методології молекулярно-генетичного оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини і харчової продукції є вкрай необхідним. Більш того, розробка розроблення вітчизняних діагностичних систем та їх практична реалізація є важливим напрямком роботи. Отже, теоретичні й практичні проблеми, досліжені в дисертаційній роботі, є актуальними.

Основні положення дисертації відображені в 15 наукових працях (з яких 6 у фахових виданнях), 1 глава – у монографії, науковий звіт та 7 тез доповідей – на наукових конференціях. Вони в повному обсязі висвітлюють зміст, результати та висновки дисертації.

Дисертація написана доволі гарною українською мовою. Дисертаційна робота складається зі анотацій, переліку умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень та їхнього обговорення, узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел, а також додатків. Текст дисертації з переліком літератури (716 джерел), ілюстраціями (83 рисунки), таблицями (113 таблиць) викладено на 545 сторінках. Додатки складають 60 сторінок.

У вступі коротко обґрунтовується актуальність теми; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; мета та завдання досліджень;

надане коротке визначення об'єкта, предмета та методів дослідження, викладені наукова новизна одержаних результатів та їхнє практичне значення; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації, публікації.

Перший розділ являє собою аналітичний огляд літератури. У ньому викладено сучасний стан досліджень щодо методики оцінювання безпечності та якості сільськогосподарської продукції тваринного і рослинного походження. Зокрема детально висвітлено стан досліджень та розвитку молекулярно-генетичних методів оцінювання безпечності та якості продукції тваринного та рослинного походження, діагностики ГМО. Також гарно описано проблему людських алергенів та методів її детекції в харчових продуктах, молекулярно-генетичної методи ідентифікації мікроорганізмів у харчовій продукції.

У розділі "Матеріали та методи" наведено підходи та методи, що застосовувалися дисертантом для вирішення поставлених завдань. Це насамперед молекулярно-генетичні (екстракція та очищення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція ПЛР та ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ), рестрикційне розщеплення ампліфікованої поліморфної послідовності, електрофорез продуктів ампліфікації, молекулярного клонування); біохімічні (визначення масової частки жиру та білку у молоці) статистичні (за використання стандартних комп'ютерних програм POPGENE 1.32 і ANOVA); біоінформатичні (вирівнювання нуклеотидних послідовностей, добір праймерів для ПЛР, підбір ендонуклеаз рестрикції для розщеплення ампліфікованої поліморфної послідовності *in silico*).

Розділ 3 присвячений результатам досліджень.

Автором було відпрацьовано методику визначення алельних варіантів трьох найбільш важливих генів кількісних ознак, пов'язаних з молочною продуктивністю ВРХ для оцінювання генетичного потенціалу тварин. Було показано виявив наявність високого рівня поліморфізму двох популяцій української чорно-рябої породи великої рогатої худоби за всіма трьома дослідженими локусами, а саме κ-казеїну (CSNK), β-лактоглобуліну (BLG) та пролактину (PRL). В ході проведення досліджень було встановлено взаємозв'язок як окремих генотипів локусів CSNK, BLG та PRL, так і їх комплексів з показниками молочної продуктивності на прикладі двох популяцій української чорно-рябої молочної худоби. Відповідно до результатів дослідження випливає, що найбільш сприятливі для сироваріння властивості молока у дослідженої популяції ВРХ визначає експресія алельних варіантів CSNK B і BLG B та меншою мірою PRL G. Отже, ці данні можна застосовувати як додатковий критерій під час проведення селекційно-племінних робіт з метою підвищення кількісних та якісних характеристик молока.

Було проведено діагностику поголів'я ВРХ на присутність вірусу лейкозу ВРХ за допомогою *TaqMan* методу ПЛР-РЧ. Результати проведених досліджень довели ефективність застосування такого підходу і у комплексі протилейкозних заходів у господарствах, і безпосередньо під час контролю безпечності продукції. Окрім того було доведено значно більшу чутливість та специфічність методу ПЛР-РЧ порівняно з «klassичними» серологічними методами аналізу. Інфікованість дослідженого поголів'я ВРХ після додаткової

перевірки зросла з 2,4 до 6,8 %. Використання молока як альтернативного діагностичного матеріалу було проаналізовано за допомогою ПЛР-РЧ. В ході виконання цього етапу роботи було з'ясовано, що для зменшення ймовірності виникнення хибно-негативних сигналів у випадку низької концентрації вірусу рекомендовано збагачувати досліджувані зразки молока соматичними клітинами, наприклад за рахунок збільшення об'єму дослідного матеріалу.

Автором було запропоновано методику визначення корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі технології SYBR®Green методу ПЛР-РЧ та доведено можливість ідентифікації групи молочнокислих бактерій та біфідобактерій у готовій молочній продукції під час контролю складу молочної мікрофлори, а також під час створення нових заквасок, пробіотиків та пробіотичних продуктів. На основі цих досліджень, було виявлено, що найбільша кількість лактобацил була присутня у зразках йогурту. Орім того, спостерігається збільшення кількості лактобацил та ентерококів у сметані та сирові порівняно з їхньою кількістю у молоці. Найбільша кількість лактобацил (108 ГЕ/мл) була присутня у зразках йогурту.

Для визначення видової належності м'яса у складі харчової продукції та сільськогосподарської продукції дисертантом було запропоновано проведення ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу та проведений добір специфічних молекулярних-генетичних Нуклеотидні послідовності маркерних генів для видів тварин (домашньої курки, свині та корови) було знайдено в інтернет-базі даних GenBank® серверу NCBI. Праймери з зондами підбирались програмного забезпечення Primer Express® (Applied Biosystems, США). В ході проведення експериментів було встановлено, що для найбільш

пріоритетного показника Ct найкращі результати перебігу ПЛР-РЧ було отримано за концентраціями 5 пкМ для праймерів та 2.5 пкМ для зондів: FAM/курятини ($Ct=12,76$); HEX/свинина ($Ct=13,18$), ROX/яловичина ($Ct=7,94$). У подальшому перевірку специфічності роботи праймерів та зондів у форматі мультиплексу було проведено шляхом тестування ДНК зразків ізольованої з широкої низки організмів, що включали типові види домашніх тварин та агрокультур, людину та кишкову паличку. Перехресних реакцій при цьому виявлено не було. Отже результати досліджень свідчать про 100 % специфічність всіх трьох обраних пар праймерів. Окрім того, на підставі отриманих даних було встановлено, що розроблена діагностична тест-система «М'ясо-тест» дає змогу ідентифікувати ДНК курки, свині та корови з межею виявлення не менш ніж 1×10^{-6} нг (1фг). Тест-систему характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу.

Дисертантом було розроблено та запропоновано до використання методологію з визначення генетично модифікованих рослин (ГМР, ГМО) методом ПЛР-РЧ з врахуванням типу сільськогосподарських культур, що вирощуються в Україні. ДНК-мішенями для підбору олігонуклеотидних праймерів та зондів були як регуляторні елементи (P-35S, T-nos) генно-інженерних конструктів, так і гени «нових ознак» – 5-енолпірувілшикимат-3-фосфат синтаза (*epsps*) із *Agrobacterium tumefaciens* штаму CP4, фосфінотрицин N-ацетилтрасфераза із *Streptomyces viridochromogenes* (*pat*), фосфінотрицин N-ацетилтрасфераза із *Streptomyces hygroscopicus* (*bar*). Окрім того було підібрано низку праймерів для видової ідентифікації сільськогосподарських культур, а саме гени лектину сої (*lec*),

алкогольдегідрогенази кукурудзи (*adhl*), круцеферину ріпаку (*cru*), глутамінсінтази цукрового буряку (*gs*) та фосфоліпази Д рису (*pld*). Ефективність роботи праймерів ретельно перевірялась. На основі отриманих результатів було відібрано праймери з найкращими характеристиками. На підставі проведених ретельних досліджень з оптимізації праймерів та ПЛР-РЧ реакцій було розроблено серію тест-систем «ГМО скринінг», «ГМО ідентифікація» і «ГМО кількість», що дає змогу ідентифікувати генно-модифіковану складову у сільськогосподарській сировині, кормах для тварин та харчовій продукції. За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи на виробництво серії тест-систем отримано ТУ У 24.6-02568182-001:2011, ТУ У 20.1-40719638-001:2019, патент на корисну модель № 72083. Окрім того, за використання розроблених тест-систем здійснено контроль за обігом ГМО в країні. Результати аналізу свідчать, що за 2007–2017 рр вміст ГМО у сільськогосподарській сировині і кормах для тварин не перевищував 7 %, а в готовій харчовій продукції – 1 %.

Дисертантом було розроблено методології визначення глютенів пшениці, жита, ячменю та вівса на основі технології TaqMan® ПЛР-РЧ. Було оптимізовано роботи обраних праймерів для роботи в форматі мультиплексу. На основі цих даних було сформовано дві мультиплексні системи, які в подальшому лягли в основу тест-системи «Глютен-скринінг». Таким чином, проведені дослідження привели до розробки тест-системи «Глютен-скринінг» на основі технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ для виявлення та ідентифікації у харчових продуктах та продовольчій сировині чотирьох злакових культур

(пшениці, жита, вівса і ячменю). Специфічність розробленої тест-системи становить 100 %.

В дисертаційній роботі було проведено велике дослідження стосовно застосування технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ для ідентифікації харчових патогенів. Молекулярні маркери були розроблені для низки харчових патогенів, а саме *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. та *Shigella* spp. В ході проведення досліджень було з'ясовано, що найбільш прийнятним кандидатом на роль гена-маркера для визначення *Salmonella* spp є ген *invA*, що кодує інвазійний білок InvA (invasion protein InvA), а для *Shigella* spp. є ген *ipAH*, який кодує інвазивний плазмідний антиген. Для визначення *L. monocytogenes* запропоновано видоспецифічну ділянку гена *hly*. Цей ген кодує бактеріальний білок лістеріолізин О, який виконує функцію лізису первинної і вторинної фагосом. В ході оптимізації запропонованої тест системи було досягнуто високої ефективності та специфічності. Широку специфічність універсальної системи детекції було підтверджено тестуванням зразків ДНК, виділених із 34 видів бактерій, що охоплюють більшість груп бактерій, описаних у Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Отже отримані результати показують, що розроблені тест-системи здатні ідентифікувати ДНК *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. і *Shigella* spp. зі специфічністю 100%.

У розділі 4 проведено аналіз та узагальнення результатів.

Автором систематизовано знання з можливостей застосування молекулярно-генетичних методів аналізу спадкового матеріалу (ДНК) для визначення низки молекулярно-генетичних маркерів, які б дозволили проводити моніторинг безпечності та якості сільськогосподарської сировини

тваринного і рослинного походження, а також готової до використання харчової продукції. У дисертаційній роботі пропонується методологія молекулярно-генетичного оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської продукції тваринного і рослинного походження, які базуються на аналізі поліморфізму послідовностей ДНК у геномах рослин, тварин і мікроорганізмів. Такий підхід дозволяє проводити системний аналіз безпечності та якості харчових продуктів і тваринного, і рослинного походження, та гарантує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів.

Основні матеріали роботи опубліковані у фахових виданнях. Автореферат достатньо повно висвітлює основний зміст дисертації, одержані експериментальні дані та повністю відповідає основним положенням дисертації. Незважаючи на загалом позитивне враження щодо наукових надбань, форми їхнього осмислення та викладення, у дисертаційній роботі є деякі недоречності, недоліки та упущення.

1. Попри великий масив даних отриманих в ході цього дослідження, дисертаційна робота має надзвичайно великий об'єм – 410 сторінок основного тексту. Текст переобтяжений надлишковим масивом інформації, що можна було упусти. Інколи таке перевантаження текстом ускладнює сприйняття та пошук необхідної інформації. В тексті наводиться багато непотрібних та загальновідомих деталей, що можна було уникнути. На мій погляд, об'єм розділу 3 можна було значно скоротити.

2. У тексті дисертації зустрічаються орфографічні та стилістичні помилки. Також є місце калькам з російської мови, зокрема «в якості».

3. У тексті зустрічаються невдалі назви малюнків. Наприклад Рис. 3.71. «Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за оптимізації умов ампліфікації...» чи Рис. 6. (Автореферат). «Рис. 6. Графіки стандартних кривих серії десятикратних розведенъ стандартних зразків, побудовані за результатами ПЛР-РЧ.» На мій погляд, було б краще назвати Рис. 3.71 – «Накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за оптимізації умов ампліфікації...» а Рис. 6. (Автореферат). - «Стандартні криві, побудовані за результатами ПЛР-РЧ серії десятикратних розведенъ ДНК» було б доречніше.

4. Висновки дуже часто мають форму звітування, а не наукових висновків. Висновки наукової роботи мають констатувати дослідженій чи встановлений в ході експериментів науковий факт (результат). Тому, висновки, що кажуть говорять про проведення моніторингу чи розробку методології без реальних даних є слабким місцем. Зокрема, це відноситься до висновків 1, 9, 10 та 11.

Попри все, вказані недоліки не впливають на загальну позитивну оцінку роботи та не зменшують її наукове значення.

Представлена робота є самостійним завершеним дослідженням, що є актуальним, виконаним на сучасному науковому та методологічному рівні, характеризується великим об'ємом проаналізованого матеріалу, новизною методологічних підходів та обґрунтованістю результатів. За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їхнім аналізом дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки.

Все вище наведене цілком переконливо доводить, що дисертаційна робота Облапа Руслана Васильовича «Методологія молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції» за актуальністю висвітлених питань, їхнім теоретичним та практичним обґрунтуванням, обсягом проведених досліджень відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» (Постанова Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р.), а її автор Облап Руслан Васильович заслуговує присвоєння наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент

Завідувач відділу рослинних харчових

продуктів та біофортифікації

ДУ «Інститут харчової біотехнології

та геноміки НАН України»

доктор біол. наук, старший наук. співробітник

С.В. Ісаєнков

Підпис завідувача відділу рослинних харчових продуктів та біофортифікації
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» доктора
біол. наук, старшого наук. співробітника С.В. Ісаєнкова завіряю.

Учений секретар,

канд.. біол.. наук, старший наук. співробітник

Я.В. Пірко

