

ВІДГУК
офіційного опонента
КЛЕЧАК Інни Рішардівни

на дисертаційну роботу **ЗАЙЧЕНКО Тетяни Олександрівни**
«Особливості росту та біосинтетичної активності штамів *Fomitopsis betulina* в
культури *in vitro*»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань
09 «Біологія» за спеціальністю
091 «Біологія»

Дисертаційна робота представляє собою комплексне наукове дослідження закономірностей росту та біосинтетичного потенціалу базидієвого гриба *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai в умовах *in vitro*.

Актуальність теми дисертації.

Лікувальні властивості базидієвих грибів відомі з давніх часів, їх широко використовували для лікування багатьох захворювань. Наразі плодові тіла та культуральний міцелій багатьох видів слугує сировиною для отримання препаратів, які використовуються як адаптогени, імуностимулятори та терапевтичні засоби для лікування різних захворювань. Їх суттєвою перевагою є відсутність токсичності та значної побічної дії. Біля 300 видів базидієвих грибів мають лікарські властивості, але не всі вони достатньо вивчені та охарактеризовані. Терапевтична ефективність *F. betulina* підтверджується сучасними науковими дослідженнями, привертають увагу його антимікробна, протипухлинна, імуномодулювальна, антиоксидантна та інші біологічні активності, але всі ці дослідження в основному стосуються дикорослих плодових тіл *F. betulina*, відомості щодо особливостей його культивування і біосинтетичної діяльності в умовах культури є фрагментарними та недостатніми. Культивування в умовах *in vitro* даного виду дасть можливість стандартизувати показники якості і прискорити процес отримання продукту. Оптимізація складу поживного середовища і умов росту та біосинтезу біологічно активних сполук дозволить регулювати метаболізм грибів з метою отримання високого виходу специфічних речовин сталого складу. З цієї точки зору дисертаційна робота Тетяни Олександрівни Зайченко, яка присвячена дослідженням особливостей росту та біосинтетичної активності штамів *Fomitopsis betulina* в культурі *in vitro*, є актуальною та перспективною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано у рамках бюджетної тематики відділу рослинних харчових продуктів та біофортифікації Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (м. Київ): «Штамоспецифічні особливості росту та синтезу метаболітів перспективних видів базидієвих грибів за різних умов культивування» (№ ДР 0112U000435, 2021–2023 рр.) та «Скринінг базидієвих грибів з високою антиоксидантною активністю, перспективних для підвищення захисних сил організму людини» (№ ДР 0124U002425, 2024–2025 рр.)

Обґрунтованість та достовірність наукових положень та висновків, рекомендацій.

Дисертація Тетяни Зайченко містить всі необхідні структурні елементи і є завершеною науковою роботою. Частини дисертаційної роботи логічно пов'язані між собою. На основі аналізу великого обсягу джерел літератури проведено обґрунтування актуальності роботи, визначено мету та сформульовано завдання. Програма проведення досліджень повністю відповідає меті та завданням роботи. Вибір всіх методик дослідження є обґрунтованим. Здобувачем проведено дуже великий обсяг експериментальних досліджень із залученням сучасних методів мікології, мікробіології, біохімії та молекулярної біології. Отримані експериментальні дані ретельно проаналізовані, проілюстровані таблицями та рисунками та опрацьовані з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки даних, цікавим є залучення кореляційного аналізу для пошуку взаємозв'язку між досліджуваними параметрами. Кожний експериментальний розділ обов'язково включає порівняння отриманих результатів з даними, описаними у літературі іншими дослідниками. Висновки узагальнюють результати дисертації, підтверджують її наукову новизну та практичне значення та дозволяють констатувати, що мета дисертаційної роботи була повністю досягнута.

Виходячи з вищенаведеного, можна стверджувати, що дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною роботою.

Наукова новизна отриманих результатів.

В ході виконання дисертаційної роботи здобувачем проведено значний обсяг досліджень, результати яких мають наукову новизну.

Так, вперше проведене комплексне дослідження біосинтетичної активності базидієвого гриба *F. betulina* за різних умов культивування та інтродуковано в культуру 11 ізолятів *F. betulina*, отриманих із дикорослих плодових тіл. Уперше у подвійній культурі встановлено антагоністичну

активність *F. betulina* відносно *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium poae*, *Microdochium nivale*. Вперше встановлено здатність штамів березової губки накопичувати екзогенні полісахариди у культурі на різних поживних середовищах та фенольні сполуки у культуральній рідині, охарактеризовано вплив параметрів культивування (рН, температури, джерел вуглецю та азоту, тривалості статичного та динамічного культивування) на рівень антиоксидантної активності та вміст фенольних сполук міцелію березової губки *in vitro*. Також вперше було встановлено кореляційні взаємозв'язки для *F. betulina* між антибактеріальною, антиоксидантною активністю, вмістом фенольних сполук, накопиченням біомаси та екзополісахаридів.

Практичне значення отриманих результатів.

Результати дисертаційної роботи мають безсумнівне практичне значення, оскільки можуть бути використані у біотехнологічних процесах на виробництві, зокрема штам *F. betulina* 2777 впроваджено у виробничий процес на підприємстві «Царство грибів» (ТОВ «ЕСМАШ-3», м. Київ). Його використання з врахуванням встановлених у дисертації особливостей культивування дозволяє забезпечити оптимальні умови для інтенсивного обростання субстрату міцелієм, що сприяє скороченню тривалості виробничого циклу, зниженню енергозатрат і підвищенню якості посівного матеріалу.

Крім того, одинадцять нових штамів *F. betulina* передано до Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК), що, безперечно, сприяє збереженню генофонду та надає можливості для використання їх для подальших фундаментальних і прикладних досліджень для всіх зацікавлених у прикладному застосуванні базидієвих грибів.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності.

Дисертаційна робота викладена на 197 сторінках машинописного тексту і складається з анотації, вступу, 6 розділів, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 170 сторінок друкованого тексту. Робота містить 6 таблиць та 48 рисунків. Список використаних джерел містить 174 найменування, з яких 25 кирилицею та 149 латиницею.

В **Анотації** на 11 сторінках українською та англійською мовами наведено узагальнення основних результатів наукових досліджень за темою дисертації, визначено наукову новизну та перспективи практичного застосування

отриманих результатів. Також наведено ключові слова та подано перелік праць дисертантки за темою дисертаційної роботи.

У **Вступі** дисертаційної роботи переконливо обґрунтовано актуальність поставленої проблеми, коректно сформульовано мету та завдання дослідження, визначено об'єкт та предмет роботи.

В розділі **Огляд літератури** обґрунтовується актуальність дослідження нових штамів *F. Betulina*, розглядаються його біоекологічні особливості, біологічно активні сполуки та терапевтичні властивості. Особливу увагу дисертант приділяє особливостям культивування гриба в умовах *in vitro*, що створює передумови для практичного застосування отриманих наукових досліджень.

Розділ **«Матеріали та методи дослідження»** містить вичерпний та детальний опис матеріалів та методів, які були використані в ході експериментального дослідження. Детально описано процеси виділення нових штамів-продуцентів, середовища для їх культивування, методи визначення показників росту та оцінювання їх морфології. Окремий підрозділ присвячено молекулярно-генетичним дослідженням, що є особливо цінним в роботі, оскільки дозволяє однозначно визначити належність виділених штамів саме до виду *F. betulina*. В розділі надано перелік тест-культур макро- та мікроміцетів, бактерій та методики для визначення антагоністичної, антибактеріальної активності, а також поверхневого та глибинного культивування, визначення антиоксидантної активності, фенолів, впливу умов культивування на ці показники.

Експериментальний матеріал структурно та змістовно відповідає поставленим завданням.

В **розділі 3** міститься матеріал щодо виділення з природних джерел та ідентифікації штамів гриба *F. betulina*, дослідження його морфологічних особливостей, швидкості радіального росту, накопичення міцелію та екзополісахаридів. Виявлено штамоспецифічні особливості культивування залежно від середовища. Встановлено, що радіальна швидкість росту коливалась в широких межах варіювання, при цьому різні поживні середовища сприяли максимальному росту різних штамів. З'ясовано, що утворення біомаси та продукування екзополісахаридів всіх досліджених штамів *F. betulina* спостерігалось на рідких поживних середовищах. Вперше визначено рівні вмісту екзополісахаридів у виду *F. betulina* в культурі. За результатами скринінгу 22 штамів за рівнем продукування міцелію та екзополісахаридів відібрано штам *F. betulina* 311. Значний інтерес представляє матеріал, який стосується підтвердження видової приналежності відібраного штаму *F. betulina* 2777 за допомогою молекулярно-генетичних методів. Результати не тільки

підтвердили належність досліджуваного штаму до виду *F. betulina*, але й були задепоновані в міжнародній базі даних GenBank (нуклеотидні послідовності ITS-регіону рДНК).

Розділ 4 присвячений дослідженню антагоністичної активності штамів *F. betulina* по відношенню до мікро- та макроміцетів. Встановлена антагоністична дія штамів *F. betulina* щодо *Aspergillus fumigatus*, *Heterobasidion annosum*, *Penicillium polonicum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium poae*, *Inonotus obliquus*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida albicans*, *Microdochium nivale*. Лише проти *Cladobotryum mycophilum* досліджувані штами не проявили активності. Уперше у подвійній культурі досліджено антагоністичну активність *F. betulina* відносно *A. fumigatus*, *C. mycophilum*, *F. poae*, *H. annosum*, *M. nivale*. Розраховано антагоністичні індекси досліджених культур та встановлено штами з високим рівнем антагоністичної активності.

Розділ 5 присвячений дослідженню біосинтетичної активності міцелію та культуральної рідини штамів березової губки і пошуку кореляції між цими показниками. Досліджено біосинтетичний потенціал штамів *F. betulina* – антибактеріальну, антиоксидантну активність етилацетатних екстрактів міцеліальної маси та культуральної рідини, а також рівень вмісту фенольних сполук. Встановлено наявність антибактеріальної активності екстрактів біомаси та культуральної рідини *F. betulina* відносно усіх досліджуваних тест-культур бактерій. Для всіх досліджених штамів березової губки встановлено наявність антиоксидантної активності та наявність фенольних сполук як екстрактів міцеліальної маси, так і культуральної рідини штамів. При порівнянні активності культуральної рідини та екстрактів міцелію визначено перспективні штами *F. betulina* 2777 і 2778.

У розділі 6 розглядаються питання оптимізації умов культивування відібраного штаму з метою отримання міцелію з підвищеним вмістом фенольних сполук та високим рівнем антиоксидантної активності. Обґрунтовано вибір розчинника для екстракції сполук з міцеліальної маси, способу та тривалості культивування, джерел азоту та вуглецю в середовищі, а також границь варіювання рН та температури. Цікавим є підрозділ, в якому проводиться кореляційний аналіз між накопиченням біомаси, фенольних сполук та антиоксидантною активністю: встановлена сильна позитивна кореляція між цими показниками в етилацетатних екстрактах міцелію. Завдяки проведеному аналізу вдалось розмістити параметри культивування у ранжованому ряду: джерела азоту → джерела вуглецю → тривалість культивування з перемішуванням → рН → тривалість культивування за стаціонарних умов → температура. Такий підхід в подальшому дозволить

прогнозувати можливості розробляти як специфічні, так і універсальні поживні середовища та прогнозувати оптимальні параметри культивування.

Всі розділи дисертаційної роботи завершуються проміжними підсумками, які узагальнюють результати виконання визначених завдань.

Розділ **«Узагальнення отриманих результатів»** містить аналіз отриманих результатів та їх обговорення, порівняння отриманих даних із дослідженнями інших науковців та сучасними розробками у галузі прикладної мікології.

Основні результати дисертації відтворено у 9 **висновках**, які відповідають поставленим завданням. Висновки інформативні, обґрунтовані і достовірні. Їх достовірність підтверджена ілюстративним матеріалом, статистичним та кореляційним аналізом. Висновки розкривають як наукове, так і практичне значення дисертації.

Слід відзначити, що викладення матеріалу у тексті дисертаційної роботи логічне і зрозуміле, експериментальні дані добре проілюстровані. Дисертаційна робота відповідає спеціальності 091 – «Біологія»

Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях.

Основні положення дисертації викладено у 10 публікаціях, у тому числі у двох статтях в періодичних виданнях, індексованих у міжнародній наукометричній базі даних Scopus Q3. Робота пройшла апробацію на наукових конференціях, за результатами яких опубліковано 8 тез доповідей. Наукові публікації за темою дисертації відповідають чинним вимогам законодавства України. Публікації вичерпно відображають основні отримані результати, підтверджують їх наукову новизну, наукову значущість та потенціал для подальших наукових та прикладних досліджень.

Запитання, зауваження та побажання.

При ознайомленні із представленою роботою виникають наступні запитання та зауваження:

1. Огляд літератури є детальним, проте в кінці розділу не вистачає узагальнення проаналізованої інформації з метою визначення саме тих напрямків, які будуть предметом подальших експериментальних досліджень.

2. У розділі «Матеріали та методи дослідження» деякі методики дуже деталізовані, водночас немає інформації, які з них були модифіковані до об'єкту дослідження.
3. В дисертації немає пояснення, чим зумовлений вибір саме таких поживних середовищ в дослідженнях швидкості росту та параметрів культивування.
4. В розділі 4, в якому розглядається антагоністична активність досліджуваних штамів, інтерпретація результатів дуже деталізована, вони потребують більшого узагальнення.
5. Результати експериментальних досліджень по біосинтезу біомаси доцільно було б оцінити також з використанням такого показника, як економічний коефіцієнт, а здатність до біосинтезу біологічно активних сполук - за продуктивністю процесу. Цей термін згадується при обговоренні результатів, але не наводяться підтверджуючі розрахунки.
6. При обговоренні результатів оптимізації умов культивування в розділі 6 використовуються як синоніми терміни «глибинне культивування», «динамічне культивування», «глибинне культивування за умов струшування», а також «поверхневе на рідкому середовищі», «статичне культивування», «культивування за статичних умов». Необхідно уніфікувати ці терміни по всій дисертації. Мова йде про культивування на рідкому середовищі глибинним способом (з перемішуванням) і поверхневим (тобто без перемішування).
7. Потребує більш ґрунтовного пояснення питання, чому була надана перевага поверхневому культивуванню, хоча результати накопичення біомаси та цільових продуктів при глибинному культивуванні не поступались, а в деяких випадках були навіть вище.
8. В дисертаційній роботі для аналізу використовується кореляційний аналіз, проте при оптимізації умов культивування варто було б розглянути також метод математичного планування (дрбно-факторний експеримент).
9. На жаль, пояснення щодо причин, які зумовлюють такі штамові відмінності за досліджуваними показниками, доволі загальні. В умовах публічного захисту хотілося б почути більш обґрунтовану теорію.
10. Базуючись на результатах науково-дослідної роботи автору доцільно було б запропонувати науково-практичні рекомендації по культивуванню відібраного штаму в умовах виробництва.
11. У тексті дисертації місцями зустрічаються складні за конструкцією речення, що ускладнює сприйняття матеріалу, низка друкарських помилок та невдалих виразів.

Проте, варто зазначити, що вищезазначені зауваження не впливають на загальне позитивне враження від роботи та не знижують достатньо високий

науковий рівень виконаної роботи, наукових і практичних результатів досліджень.

Загальний висновок і оцінка дисертації щодо її відповідності чинним вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Таким чином, дисертаційна робота Зайченко Тетяни Олександрівни являє собою закінчену науково-дослідну роботу, яка вирішує актуальні завдання щодо виділення нових штамів *Fomitopsis betulina* з природних джерел та визначення оптимальних умов їх культивування з метою забезпечення біосинтетичної діяльності в умовах *in vitro*. Актуальність обраної проблеми, високий методичний рівень проведених досліджень, наукове й практичне значення отриманих результатів дозволяє вважати, що дисертаційна робота Зайченко Т.О. відповідає спеціальності 091 - «Біологія» та вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії, а саме пунктам 6, 7, 8 і 9 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової Вченої рада закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою КМУ від 12.01.2022 р. № 44. На підставі вищевикладеного, вважаю, що Зайченко Тетяна Олександрівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія», зі спеціальності 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

Кандидат технічних наук, доцент
Доцент кафедри промислової біотехнології
та біофармації факультету
біотехнології і біотехніки
Національного технічного університету України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського»

Інна КЛЕЧАК