

ВІДГУК
офіційного рецензента на дисертаційну роботу
Зайченко Тетяни Олександрівни
«Особливості росту та біосинтетичної активності штамів *Fomitopsis betulina*
в культурі *in vitro*», представлену на здобуття наукового ступеня доктора
філософії за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми дослідження. Протягом тривалого часу лікарські макроміцети привертають увагу дослідників по всьому світу завдяки здатності до утворення цінних біологічно активних речовин різної хімічної природи. Одним із відомих у народній медицині грибів є березова губка *Fomitopsis betulina*, численні біологічні активності якого підтверджені сучасними дослідженнями. Міцеліальна маса цього поліпорового гриба може бути перспективною сировиною для створення терапевтичних засобів з антимікробними, протизапальними, протипухлинними, імуномодулювальними та антиоксидантними властивостями.

Однак, більша частина робіт стосовно біологічної активності березової губки присвячена дикорослим плодовим тілам, і лише окремі дослідження здійснено з продуктами вирощування *F. betulina* в культурі *in vitro*, а саме з міцелієм і культуральною рідиною. Тож виникає потреба у пошуку нових продуцентів біологічно активних речовин серед штамів *F. betulina*, розробці протоколів зі стандартизованими умовами культивування міцелію березової губки, підборі методів екстракції та отримання цільових сполук. Тому актуальність дисертаційної роботи не викликає сумнівів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності. Дисертація Зайченко Т.О. демонструє високий ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень і висновків. Дослідження проводилося із використанням загальноприйнятих методів, а отримані експериментальні дані супроводжувалися ретельним аналізом та обговоренням. Додатково здійснено статистичний аналіз кореляцій між дослідженими показниками, що дозволяє зробити обґрунтовані висновки з отриманих даних.

Повнота викладу у фахових виданнях та апробація основних результатів. Ключові положення дисертаційної роботи Зайченко Т.О. були опубліковані у 10 наукових працях, серед яких 2 статті у фахових виданнях, включених до баз даних Scopus та Web of Science **Q3**, що підтверджує наукову цінність, актуальність та новизну дослідження. Результати роботи були представлені на 8 наукових конференціях, що підкреслює факт активної апробації дослідження в науковій спільноті.

Наукова новизна. Дисертаційна робота Зайченко Т.О. є комплексним дослідженням штамоспецифічної біосинтетичної активності *F. betulina* за різних умов культивування *in vitro*. З метою отримання нових штамів-продуцентів інтродуковано в культуру 11 ізолятів *F. betulina*, отриманих із плодових тіл дикорослих грибів. Вперше встановлено здатність березової губки накопичувати екзополісахариди *in vitro* на різних поживних середовищах, а також фенольні сполуки у культуральній рідині. Вперше встановлено антагоністичну активність *F. betulina* у подвійній культурі відносно таких грибів як *Aspergillus fumigatus*, *Cladobotryum mycophilum*, *Fusarium poae*, *Heterobasidion annosum*, *Microdochium nivale*. Вперше досліджено та проаналізовано вплив параметрів культивування (рН, температури, джерел вуглецю та азоту, тривалості статичного та динамічного культивування) на рівень антиоксидантної активності та вміст фенольних сполук міцелію штаму *F. betulina* 2777 *in vitro*. Вперше для березової губки обчислено кореляцію одночасно між кількома параметрами: антибактеріальною, антиоксидантною активністю, вмістом фенольних сполук, накопиченням біомаси та екзополісахаридів. Це дозволяє охарактеризувати метаболічний профіль штамів *F. betulina* та визначити сприятливі умови культивування для отримання біологічно активних речовин.

Практичне значення одержаних результатів. Одинадцять ізольованих штамів *F. betulina* передано до Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК), що сприяє збереженню генофонду макроміцетів та створює підґрунтя для подальших біотехнологічних та мікологічних досліджень. Секвеновано послідовність маркерного ITS-

фрагменту рДНК штаму *F. betulina* 2777, яку внесено у GenBank під реєстраційним номером PQ184655. Штам *F. betulina* 2777 впроваджено у виробничий процес на підприємстві «Царство грибів» (ТОВ «ЕСМАШ-3», м. Київ) з метою підбору умов для інтенсивного обростання субстрату міцелієм, щоб ефективно отримувати посівний матеріал. Також наукові та прикладні результати дисертаційної роботи можуть бути використані науковцями, викладачами, аспірантами та здобувачами освіти біологічного та біотехнологічного профілів.

Академічна доброчесність. Дисертаційна робота виконана з дотриманням принципів академічної доброчесності. Авторка коректно використовує ідеї та результати інших дослідників з відповідними посиланнями на них.

Оцінка структури, змісту та форми дисертації. Дисертація має чітку структуру, яка включає анотацію, вступ, шість розділів, узагальнення результатів дослідження, висновки, список використаних джерел та додатки. Матеріал викладено послідовно, логічно та ґрунтовно. Загальний обсяг рукопису становить 197 сторінок, включаючи 48 рисунків, 6 таблиць, 4 додатки та 174 джерела літератури.

У вступі розкрито актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано об'єкт і предмет дослідження, мету та завдання, вказано на зв'язок дисертації з науковими програмами, планами і темами, підкреслено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, відображено дані про апробацію результатів досліджень, публікації і структуру дисертаційної роботи, а також виділено особистий внесок здобувачки.

У розділі 1 дисертанткою надано загальну характеристику виду *Fomitopsis betulina* (Bull.) B. K. Cui, M. L. Han & Y. C. Dai згідно з літературними даними. Зокрема охарактеризовано його філогенетичне положення, макроморфологічні ознаки, роль в екологічних нішах. Наведено терапевтичні властивості березової губки (протипухлинна, антиоксидантна, протизапальна, антибактеріальна, антимікотична, протівірусна, нейропротекторна) та пов'язані з ними біологічно

активні речовини. Проаналізовано низку праць по вирощуванню *F. betulina in vitro*, на основі чого обґрунтовується актуальність дисертаційного дослідження.

У розділі 2 наведено матеріали та методи досліджень. Перераховано включені в роботу біологічні об'єкти (22 штами *F. betulina*, 5 бактеріальних культур, 2 макроміцети та 8 мікроміцетів). Описано методики перевірки видової приналежності гриба, культивування, оцінки росту та морфології штамів дослідженого гриба, визначення біологічної активності (антагоністичної, антибактеріальної, антиоксидантної) та вмісту окремих метаболітів (екзополісахаридів та фенолів), встановлення впливу умов культивування на біосинтетичні показники окремого штаму гриба.

Розділ 3 містить результати інтродукції 11 ізолятів *F. betulina*, вивчення ряду морфологічних показників та швидкості росту міцелію 22 штамів *F. betulina* на агаризованих поживних середовищах, накопичення міцеліальної маси та екзополісахаридів на рідких середовищах. Для останніх двох показників окремо проведено кореляційний аналіз. За результатами досліджень дисертантка відмітила перспективний штам *F. betulina* 311, який на Сабуро-декстрозному середовищі мав високі рівні накопичення біомаси та екзогенних полісахаридів.

У розділі 4 детально проаналізовано здатність 22 штамів *F. betulina* до антагоністичної активності відносно мікроскопічних грибів *A. fumigatus*, *A. niger*, *Candida albicans*, *Cladobotryum mycophilum*, *F. poae*, *M. nivale*, *Penicillium polonicum* та *Pichia kudriavzevii* та макроміцетів *H. annosum* й *Inonotus obliquus*. Опис усіх специфічних взаємодій між грибами супроводжується фотографіями та ілюстративними прикладами. Інтенсивність конкуренції штамів березової губки з тест-культурами визначалася за антагоністичним індексом, який розраховувався за типами реакцій. Встановлено культури *C. albicans*, *I. obliquus*, *M. nivale* та *P. kudriavzevii* як найбільш піддатливі до дії березової губки, а штами *F. betulina* 978, 989, 2364, 2770, 2771 та 2772 відмічено як перспективні антагоністи щодо протестованих грибів.

Розділ 5 містить аналіз біологічної активності 22 штамів *F. betulina*, а саме антибактеріальної (відносно *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), антиоксидантної та

вмісту фенольних сполук. Ці показники визначалися в етилацетатних екстрактах культуральної рідини та міцелію штамів. Статистична обробка даних здійснена з проведенням кореляційного аналізу між визначеними показниками, а також рівнями накопичення біомаси та екзополісахаридів. Підсумовуючи цей етап досліджень, авторка виділила штами *F. betulina* 2777 та 2778 як перспективні для подальшої роботи через комбінацію їхніх властивостей: *F. betulina* 2777 мав найвищий вміст фенолів у культуральній рідині, *F. betulina* 2778 – найширший спектр антибактеріальної активності, при цьому обидва штами володіли високою антиоксидантною активністю ($\geq 80\%$).

У розділі 6 дисертантка обрала для подальшого аналізу штам *F. betulina* 2777, описавши процес вибору. Для даного штаму було обрано оптимальний екстрагент (етанол 70 %) і вивчено вплив параметрів культивування (температури, способу та тривалості, джерел вуглецю та азоту, а також рН) на ріст біомаси, утворення фенолів та рівень антиоксидантної активності. Проведення кореляційного аналізу за цими показниками дозволило сформулювати висновки і бачення подальших біотехнологічних досліджень штаму *F. betulina* 2777.

Узагальнення результатів досліджень містять стислу інформацію з експериментальних розділів 3–6, висновки сформовано згідно з поставленими завданнями, відображаючи результати роботи.

У додатках наведено список публікацій здобувачки, фрагмент ITS-послідовності рДНК штаму *F. betulina* 2777, акт приймання-передачі ізолятів *F. betulina* 2777 до Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, акт впровадження наукової розробки на підприємстві «Царство грибів» (ТОВ «Есмаш»).

Вважаю, що робота відповідає вимогам, що висуваються до дисертаційних робіт, має актуальність, наукову новизну та достатній обсяг.

Дискусійні положення, зауваження та побажання щодо змісту та оформлення дисертації.

1. За яким принципом відбирали культури грибів та бактерій для дослідження антагоністичної та антибактеріальної активності?

2. Чому в ході скринінгових досліджень штамів *F. betulina* для отримання екстрактів з міцелію та культуральної рідини обрали саме етилацетат?
3. Різницю між штамми *F. betulina* 2777 та 2778 визначали візуально при спільному культивуванні. Чи не було б доцільніше це здійснити молекулярно-генетичними методами?
4. У дослідженні використовували 22 штами березової губки, але секвенування ITS-послідовності проводили лише для одного, чому?
5. У розділі 3 розшифрування абревіатур під рисунками не винесені в примітки, як в інших розділах.
6. У додатку Б з нуклеотидною послідовністю не вказано номер штаму, для якого робили секвенування.

Також в тексті роботи зустрічаються друкарські та орфографічні помилки, невдалі мовленнєві конструкції.

Загальний висновок рецензента. Дисертаційна робота Зайченко Тетяни Олександрівни «Особливості росту та біосинтетичної активності штамів *Fomitopsis betulina* в культурі *in vitro*» є завершеним дослідженням, що вирізняється актуальністю, новизною та практичною значущістю. Робота відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12.01.2022 із змінами, та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її авторка, Зайченко Тетяна Олександрівна, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії (PhD) у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Рецензент дисертації,

учений секретар ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

д.б.н., с.н.с.



Ярослав ПІРКО