ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Михайлової Оксани Борисівни
на тему «Біотехнологічні основи регуляції біосинтетичної активності лікарських макроміцетів за допомогою екологічно безпечних фізичних факторів», подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.20 — Біотехнологія

Ступень актуальності теми дисертації

Одним із пріоритетних напрямів сучасної фармацевтичної промисловості є розробка та впровадження біотехнологічних процесів для отримання ефективних і безпечних лікувальних біопрепаратів. Сучасні дослідження підтверджують, що їстівні та лікарські макроміцети синтезують широкий спектр біологічно активних речовин із значним біомедичним потенціалом. У контексті глобальних зусиль сталого розвитку лікарські макроміцети розглядаються як перспективні джерела для створення функціональних продуктів харчування, нутрицевтиків та біологічно активних добавок.

Визначення ключових факторів, що регулюють життєдіяльність макроміцетів, дозволяє контролювати їхню біосинтетичну активність *in vitro* та отримувати цінні біотехнологічні продукти. Одними з перспективних регуляторних чинників є штучне світло, а також можуть бути наночастинки металів, які за певних умов здатні впливати на біофізичні та біохімічні процеси у живих організмах, зокрема й у грибах. У зв'язку з цим вивчення впливу низькоінтенсивного LED та лазерного світла, а також наночастинок металів на біосинтетичну активність лікарських макроміцетів за умов глибинного культивування набуває особливої актуальності. Ці чинники можуть відкривати нові можливості для оптимізації процесів культивування макроміцетів та підвищення їхньої продуктивності.

Попри значний науковий інтерес, вплив наночастинок на біосинтетичну активність грибів залишається недостатньо вивченим. Особливо важливим є дослідження комбінованого впливу низькоінтенсивного штучного світла та різних наночастинок на біосинтетичні процеси лікарських макроміцетів за умов глибинного культивування. Розуміння механізмів їхнього впливу дозволить не лише з'ясувати і покращити біосинтетичну активності грибів, а й удосконалити споживчі властивості продуктів на їх основі. Саме тому, дисертаційна робота, яка спрямована на вирішення цих питань та впровадження отриманих результатів у практику, є актуальною та перспективною у контексті розвитку сучасних біотехнологій.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дослідження проводили протягом 2009—2024 рр. відповідно до науково-технічної роботи кафедри трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського за державним замовленням на науково-технічні (експериментальні) розробки та науково-технічну продукцію (№ державної реєстрації − 0122U200933) «Розроблення методів підвищення біологічної активності харчових продуктів для спеціальних медичних цілей» (Договір № ДЗ/І 28 − 2022 від 27 вересня 2022р.), а

також згідно з планами науково-дослідних програм роботи відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України: «Фізіолого-морфологічна характеристика лікарських макроміцетів та їх біосинтетична активність у культурі» (№ держаної реєстрації – 0104U009743) (2005–2009 рр.), «Біологічні властивості сапротрофних макроміцетів в культурі» (№ державної реєстрації – 0110U001264) (2010–2014 рр.) «Біологічні властивості штамів колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки *ІВК»* (№ державної реєстрації – 0115U002001) (2015–2018 рр.), «Біологічна активність штамів колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки *ІВК»* (№ державної реєстрації – 0120U101111) (2019–2024 рр.), «Колекція культур шапинкових грибів ІВК». Фінансування роботи підтримано грантом НАН України на виконання інноваційного проекту «Розробка та підготовка до впровадження інтенсивної технології вирощування їстівних та лікарських грибів на основі енергоефективних систем штучного освітлення» (№ державної реєстрації – 0111U003274) (2011 р.). Тема дисертації затверджена Вченою радою Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», протокол № 9 від 02.10.2023 року.

Наукова новизна і **достовірність отриманих у роботі результатів**, **сформульованих положень і висновків**

Інформація, наведена в дисертаційній роботі, рефераті, наукових публікаціях Михайлової О.Б., свідчить про наукову обґрунтованість і достовірність отриманих результатів. Положення, що виносяться на захист, відповідають критеріям наукової новизни. Зокрема, вперше розроблено методичні підходи застосування низькоінтенсивного LED- і лазерного світла, а також наночастинок металів у біотехнологіях глибинного культивування лікарських макроміцетів для цілеспрямованої регуляції їхньої біосинтетичної активності.

Запропоновано нові екологічно безпечні біотехнологічні рішення для цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності лікарських макроміцетів *Hericium erinaceus, Inonotus obliquus, Lentinula edodes, Pleurotws eryngii, Laricifomes officinalis* з використанням енергоефективних джерел низькоінтенсивного LED- та лазерного світла з контрольованими спектральними та енергетичними характеристиками, що дозволило підвищити утворення міцеліальної маси, а також синтез полісахаридів, ненасичених жирних кислот, поліфенолів, меланіну, а також антиоксидантну та антимікробну активності у макроміцетів за умов глибинного культивування.

Вперше встановлено закономірності впливу наночастинок (AgНЧ, FeНЧ, MgНЧ) на утворення міцеліальної маси, синтез біологічно активних речовин (полісахаридів, поліфенолів, меланінів, флавоноїдів), а також антиоксидантної та антимікробної активності досліджених видів грибів.

Вперше одержано нові науково обґрунтовані теоретичні та експериментальні результати та виявлено закономірності комбінованого впливу низькоінтенсивного лазерного світла та наночастинок металів на утворення міцеліальної маси та синтез біологічно активних речовин (полісахаридів, поліфенолів, флавоноїдів). Все це формує основу для створення інноваційних

біотехнологій, спрямованих на підвищення ефективності культивування лікарських макроміцетів з метою подальшого їх практичного використання.

Практична значимість

У результаті проведеного дослідження морфолого-культуральних особливостей 29 штамів 9 видів 8 родів базидієвих макроміцетів з Колекції культур шапинкових грибів (IBK) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України для кожного штаму визначено комплекс морфолого-культуральних характеристик, які дозволяють підтверджувати таксономічний статус чистих культур і забезпечувати контроль їхньої чистоти на різних етапах біотехнологічних процесів.

За допомогою молекулярно-генетичних методів підтверджено видову приналежність 10 штамів 5 видів з родів *Hericium* Pers., *Laricifomes* Kotl. & Pouzar, *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm., *Sparassis* Fr. з колекції IBK. Відповідні нуклеотидні послідовності депоновано в міжнародну базу даних GenBank NCBI.

У результаті проведеного багатоступеневого скринінгу штамів-продуцентів, перспективних для біотехнологічного застосування, визначено фізико-хімічні чинники, які регулюють життєдіяльність культур. Для 15 штамів 9 видів лікарських макроміцетів складено паспорти культур.

Розроблено методичні підходи для цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності шляхом модифікації існуючих біотехнологій отримання міцеліальної маси та біологічно активних сполук лікарських макроміцетів, що дозволило скоротити терміни культивування на дві доби та збільшити вихід міцеліальної маси з підвищеним вмістом біологічно активних сполук на 30−132%.

На основі отриманої міцеліальної маси з підвищеним вмістом ендополісахаридів, ненасичених жирних кислот, поліфенольних сполук, меланінів розроблено харчовий продукт: *«Мікolмун Комплекс», «Мікolмун Гериций», Мікolмун Іноnотус».* Проведено гігієнічне регламентування показників якості та безпеки, розроблено технічні умови для харчових продуктів для спеціальних медичних цілей. Розроблено композицію готової форми у вигляді твердих желатинових капсул на основі грибної сировини. Виготовлено дослідні партії продуктів та створено проекти інструкцій з їх застосування.

Відсутність порушення академічної доброчесності

Дисертація Михайлової О.Б. є самостійним науковим дослідженням, що містить оригінальні ідеї та авторські напрацювання, які дозволили успішно вирішити поставлені завдання. У роботі представлено результати власних досліджень, положення та висновки сформульовані на основі проведених експериментальних досліджень. Усі використані матеріали інших авторів мають відповідні посилання на першоджерела.

Обґрунтованість наукових положень, висновків, рекомендацій в дисертації, їхня достовірність

Дисертаційна робота Михайлової О.Б. виконана на достатньо високому науковому рівні та є завершеним дослідженням із чітко сформульованими цілями та завданнями. Обґрунтованість наукових положень дисертації забезпечується

достовірністю отриманих експериментальних результатів із застосуванням сучасних методик і відповідних аналітичних підходів.

Достовірність висновків підтверджено значним обсягом експериментальних досліджень, статистичною обробкою даних та аналізом отриманих результатів у відповідності до загальноприйнятих наукових стандартів. У процесі детального аналізу дисертаційної роботи та реферату не виявлено тверджень, що викликають сумніви щодо коректності інтерпретацій даних або достовірності результатів.

Наукові положення, висновки та рекомендацій, сформульовані у дисертації, пройшли апробацію на наукових конференціях, що підтверджує їхню актуальність для біотехнологічної галузі і практики.

Повнота викладення результатів роботи в наукових публікаціях

Основні результати роботи, які представлено для захисту, ґрунтуються на експериментальних даних, отриманих автором, і відображені у 49 наукових працях, з них 15 статей, які опубліковані у наукових періодичних виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України (в т.ч. 2 статті, що включені до міжнародної наукометричної бази SCOPUS, 1 стаття − до Web of Science Core Collection); 10 статей у наукових періодичних виданнях інших держав з напряму, з якого підготовлено дисертацію, (в т.ч. 1 стаття включена до наукометричної бази даних SCOPUS, 7 статей, що включені до наукометричних баз даних SCOPUS та Web of Science Core Collection та віднесені до другого третього квартилів (Q2—Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports), 3 статті, які додатково відображають наукові результати дисертації, 1 колективна монографія, 1 розділ у колективній монографії, 1 патент на корисну модель, 18 тез доповідей у матеріалах міжнародних і всеукраїнських наукових конференцій.

Оцінка структури, змісту та форми дисертаційної роботи та її завершеності

Дисертаційна робота с завершеною науковою працею. Робота складається з анотацій (українською та англійською мовами), вступу, семи розділів (що включають огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень та їхнє обговорення), висновків, списку використаної літератури (635 найменувань) та додатків А − Г. Обсяг дисертації становить 527 сторінок комп'ютерного тексту. Робота добре проілюстрована 87 оригінальними авторськими рисунками і 49 таблицями.

Характеристика дисертації за розділами

У **Розділі 1 «Сучасний стан** і **перспективи використання їстівних та лікарських макроміцетів**» проведено ґрунтовний аналіз сучасних наукових публікацій, безпосередньо пов'язаних із темою дисертаційного дослідження. Висвітлено сучасний рівень знань і перспективи використання їстівних та лікарських макроміцетів, як джерела біологічно активних речовин. Детально описано поживну цінність біотехнологічно важливих видів грибів, а також основні фармакологічні ефекти та механізми дії їхніх активних компонентів. Окрему увагу приділено сучасним підходам до регуляції біосинтетичної активності грибів, зокрема використанню штучного світла та наночастинок у

біотехнологіях їхнього культивування. Розглянуто механізми їхньої дії та можливості оптимізації синтезу біологічно активних речовин для підвищення харчової цінності грибів. Визначено потенційні можливості застосування штучного світла та наночастинок як інструменту для спрямованої регуляції біосинтетичної активності макроміцетів. З урахуванням цих факторів було сформульовано відповідні задачі для подальшого дослідження.

У **другому розділі «Матеріали і методи досліджень»** наведено розгорнутий опис методів дослідження, модельних об'єктів і застосованих у роботі експериментальних підходів. Для проведення досліджень автором було використано сучасні мікологічні, мікробіологічні та фізіолого-біохімічні методи. Використано сканувальну та трансмісійну електронну мікроскопію, рентгеноструктурний аналіз металовмісних наночастинок, проведено фармакогностичний аналіз грибної сировини.

Особливо слід відзначити унікальні фотобіологічні методи, розроблені та адаптовані автором в рамках цієї дослідницької роботи. Вони включають підбір енергоефективних джерел штучного світла з контрольованими спектральними й енергетичними характеристиками для фотоактивації інокулюму.

Розділ 3 «Морфолого-культуральні особливості біотехнологічно важливих штамів їстівних та лікарських макроміцетів *in vitro»* складається з трьох підрозділів, у яких представлено експериментальні дані щодо їх морфофізіологічних і молекулярно-генетичних досліджень. Зокрема, за допомогою молекулярно-генетичних методів досліджень підтверджено видову приналежність 9 штамів, що належать до 5 видів і 4 родів відділу *Basidiomycota.* Отримані нуклеотидні послідовності досліджених штамів зареєстровано в NCBI GenBank, що є важливим внеском у наукову базу даних. Для виду *Laricifomes officinalis* за допомогою сканувальної електронної мікроскопії отримано нові дані щодо мікроморфології вегетативного міцелію *in vitro.* Встановлено морфофізіологічні ознаки для кожного дослідженого виду, що дозволяє здійснювати коректну ідентифікацію культур у вегетативній стадії розвитку, а також доповнює критерії оцінки таксономічної приналежності штамів при зберіганні в умовах колекції.

У **розділі 4 «Фізіологічні особливості росту та біосинтетичної активності їстівних та лікарських макроміцетів *in vitro»*** надано результати та аналіз власних досліджень багатоступеневого скринінгу штамів, перспективних для біотехнологічного використання. Наведено основні фізико-хімічні чинники, що регулюють процеси життєдіяльності досліджених культур. Для 20 штамів, що належать до 8 видів і 7 родів, визначено оптимальні параметри росту, зокрема кислотність середовища, джерела вуглецю та азоту, що дозволяє підвищувати продуктивність культур. Для перспективних штамів проведено порівняльний аналіз динаміки росту в умах глибинного культивування. Визначено вміст загальних фенольних сполук у етанольних та метанольних екстрактах міцеліальної маси, а також їхню антиоксидантну активність. Окрім цього, досліджено вміст меланінів у міцеліальній масі та культуральній рідині штамів *I. obliquus,* отримано нові дані щодо наявності цитокінінів у міцелію *H. erinaceus, L. officinalls* та *S. crispa.*

Особливу цінність отриманих експериментальних результатів становить те, що дисертантка за результатами багатоступеневого скринінгу відібрала потенційно перспективні штами лікарських макроміцетів для подальших біотехнологічних досліджень.

У **розділі 5 «Фоторегуляція біосинтетичної активності їстівних та лікарських макроміцетів *in vitro*»** представлено результати та обговорення власних досліджень, присвячених вивченню спектральної чутливості п'яти штамів цінних лікарських макроміцетів: *I. obliquus, H. erinaceus, L. officinalis, P. eryngii, L. edodes*. У ході досліджень встановлено закономірності та індивідуальні особливості реакцій досліджених штамів макроміцетів на лазерне та LED опромінення. Визначено спектральні параметри світлової обробки низькоінтенсивним світлом міцелію, що дозволяє цілеспрямовано регулювати накопичення міцеліальної маси та певних біологічно активних сполук, зокрема полісахаридів, фенольних сполук, меланінів, а також впливати на жирнокислотний профіль міцелію. Встановлено вплив світлового фактору на антиоксидантну та антимікробну активність екстрактів міцелію.

Отримані результати дали змогу дисертантці розробити вітчизняний харчовий продукт для спеціальних медичних цілей, виготовлений на основі грибної сировини чотирьох досліджених штамів їстівних та лікарських макроміцетів.

У **розділі 6 «Використання світлового фактору і колоїдних розчинів наночастинок металів для регуляції біосинтетичної активності макроміцетів**» вперше представлено певні закономірності впливу наночастинок срібла (AgНЧ), заліза (FeНЧ) та магнію (MgНЧ) на біосинтетичну активність чистих культур лікарських макроміцетів: *H. erinaceus* ІВК 977, *I. obliquur* ІВК 1877, *L. officinalis* ІВК 5004, *L. edodes* ІВК 2541, *P. eryngii* ІВК 2035. Вперше представлено дані по комбінованому впливу зазначених наночастинок та низькоінтенсивного лазерного світла на утворення міцеліальної маси, синтез екзо- та ендополісахаридів, фенольних сполук, меланінів та флавоноїдів за умов глибинного культивування.

Аналіз отриманих результатів дозволив встановити, що додавання AgНЧ, FeНЧ, MgНЧ до інокуляту всіх досліджених видів стимулювало ріст міцеліальної маси в межах від 5,2% до 79% у порівнянні з контролем. Найбільший стимулювальний ефект на утворення міцелію спостерігали при застосуванні FeНЧ та MgНЧ. Проте опромінення інокуляту синім світлом у живильному середовищі з наночастинками знижувало ростову активність міцелію на 12,3% − 35,4%.

Аналіз результатів щодо впливу AgНЧ, FeНЧ, MgНЧ та фотоіндукованих наночастинок продемонстрував різні ефекти на синтез екзо- та ендополісахаридів у досліджених видів. Вперше встановлено, що застосування FeНЧ, MgНЧ та фотоактивованих FeНЧ, MgНЧ стимулювало синтез фенольних сполук та антиоксидантну активність міцелію досліджених видів.

Вперше продемонстровано, що AgНЧ, FeНЧ підвищують антибіотичну активність культуральної рідини порівняно з контролем.

У **розділі 7 «Практичне використання отриманих результатів**» дисертанткою узагальнено закономірності впливу світлового фактору та AgНЧ,

FeНЧ та MgНЧ на біосинтетичні процеси лікарських макроміцетів за умов глибинного культивування. Розроблено практичні рекомендацій щодо регуляції біосинтетичної активності з метою підвищення накопичення міцеліальної маси та синтезу біологічно активних речовин.

Висновки логічно випливають з описаних результатів досліджень та відповідають змісту дисертаційної роботи.

У той же час в процесі ознайомлення з дисертаційною роботою у мене додатково виникли наступні зауваження і запитання, на які хотілось би отримати відповіді:

1) Рисунки, які наведено у Розділі 1, чи є всі оригінальними, якщо ні, то варто було б надати посилання на відповідне джерело, з якого він (вони) були взяті.
2) Не варто писати по тексту «синтез міцеліальної маси», краще використати термін «утворення» або «накопичення» міцеліальної маси.
3) У розділі 4 після підрозділу 4.5 «Аналіз вмісту загальних фенольних сполук у екстрактах міцеліальної маси» логічно було б розмістити підрозділ 4.7 «Аналіз антиоксидантної активності екстрактів міцеліальної маси».
4) Стор. 232 Підрозділ 5.1 «Аналіз динаміки росту їстівних та лікарських макроміцетів за умов глибинного культивування при використанні фотоіндукованого інокулюму». Чому в експерименті опромінювали штами-продуценти *Hericium erinaceus Lentinula edodes, Pleurotus eryngii, Laricifomes officinalis* лише синім лазерним світлом, а LED опромінення проводили у трьох діапазонах (синій, червоний та зелений)?
5) Розділ 6. «ВИКОРИСТАННЯ СВІТЛОВОГО ФАКТОРУ І КОЛОЇДНИХ РОЗЧИНІВ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ ДЛЯ РЕГУЛЯЦІЇ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ МАКРОМІЦЕТІВ». Чи проводилися крім Вас дослідження по впливу AgНЧ, FeНЧ та MgНЧ на ріст та фізіологічну активність макроміцетів *in vitro* чи *in vivo*?

Висновок офіційного опонента щодо відповідності дисертації встановленим вимогам

Представлена дисертаційна робота Михайлової Оксани Борисівни на тему «Біотехнологічні основи регуляції біосинтетичної активності лікарських макроміцетів за допомогою екологічно безпечних фізичних факторів» є завершеною науковою працею яка за актуальністю, науковою новизною, обґрунтованістю та достовірністю наукових положень, отриманими новими науково-обґрунтованими результатами, висновками, практичними рекомендаціями та реалізацією відповідає паспорту спеціальності 03.00.20 – «Біотехнологія». Реферат дисертації достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації.

Дисертаційна робота відповідає вимогам п. п. 7, 8, та 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук» затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ № 502 від 19.05.2023 р., та зі

змінами, внесеними згідно з Постановою КМУ 507 від 03.05.2024 р.), а ії автор Михайлова Оксана Борисівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 — Біотехнологія.

Офіційний опонент
завідувач відділу клітинної біології та біотехнології
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України», член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор Алла ЄМЕЦЬ

Підпис чл.-кор. НАН України А.Ємець засвідчую:
Вчений секретар Інституту,
д.б.н., с.н.с. Ярослав ПІРКО