

ВІДГУК
офіційного опонента доктора біологічних наук,
старшого наукового співробітника,
провідного н.с. відділу генетичного поліпшення рослин
Інституту фізіології рослин і генетики НАН України
ПРЯДКІНОЇ Галини Олексіївни

на дисертаційну роботу **МИХАЙЛОВОЇ Оксани Борисівни**
«БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ РЕГУЛЯЦІЇ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ
ЛІКАРСЬКИХ МАКРОМІЦЕТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ЕКОЛОГІЧНО БЕЗПЕЧНИХ
ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ»,

представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
зі спеціальності 03.00.20 – Біотехнологія

Актуальність теми досліджень. Дисертаційна робота Оксани Борисівни МИХАЙЛОВОЇ присвячена дослідженню біотехнологічних основ застосування низькоінтенсивного LED- і лазерного світла та колоїдних розчинів наночастинок (НЧ) металів для регуляції біосинтетичної активності лікарських макроміцетів.

Актуальність тематики обумовлена соціальною, екологічною та економічною значимістю теми досліджень. Відомо, що в сучасних умовах одним із найдефіцитніших компонентів у харчуванні людини є повноцінний білок. Високий вміст білка, подібний до тваринного амінокислотний профіль та його значне засвоєння обумовлюють важливість використання грибів як альтернативного джерела білка. Необхідність нарощування виробництва їстівних грибів визначає той факт, що у світі стає все більш людей, які дотримуються здорового образу життя. Саме якість харчування пов'язана з фізичним розвитком, здоров'ям та формуванням імунітету людини. Окрім харчової та смакової цінності їстівних грибів, наявність в них хітину зберігає довше почуття ситості, а їх довше перетравлювання, тобто зменшення енергетичної доступності, може сприяти схудненню. Завдяки численним висновкам щодо харчової та оздоровчої користі грибів для людства, гриби зараз використовуються як інгредієнти для покращення харчових і функціональних якостей харчових продуктів, а також як дієтичні добавки.

Крім цього, у цілому світі спостерігається також і зростання споживання лікарських макроміцетів, які є джерелом цілої низки різних сполук: білків, полісахаридів, поліфенолів, глікопептидпротеїнових комплексів, тритерпенів та інших, в тому числі унікальних, що зустрічаються лише у грибів. Ці сполуки обумовлюють їх антиоксидантні, протизапальні, протимікробні, протипухлинні та імуностимулюючі властивості. Все це може сприяти захисту організму людини від таких важких захворювань, як онкологічні, серцево-судинні, ендокринологічні та ін.

Позитивний вплив використання макроміцетів на довкілля полягає в тому, що для виготовлення одного кг тваринного білка витрачається приблизно в 10 разів більше води, ніж для виробництва грибів. Ще одним екологічним аспектом їх використання є зменшення рівня CO₂ в атмосфері за рахунок заміни тваринного білка протеїнами грибів. Зменшення викидів парникових газів відповідає Європейському зеленому курсу і Паризькій угоді на побудову кліматично нейтральної економіки.

Зростання попиту на їстівні та лікарські гриби потребує і збільшення їх виробництва. А це, в свою чергу, вимагає розробки наукових основ та впровадження інноваційних біотехнологічних методів культивування макроміцетів, спрямованих на збільшення їх продуктивності та на інтенсифікацію їх біосинтетичної активності. Розвиток біотехнологій на основі міцеліальних культур макроміцетів потребує розширення фундаментальних знань у таких аспектах як виявлення закономірностей росту, з'ясування оптимальних умов культивування, вдосконалення методів скринінгу перспективних продуцентів, встановлення особливостей метаболізму та біосинтетичної активності. Ще одним важливим питанням

розробки таких біотехнологій є можливість нарощування їх виробництва із застосуванням екологічно безпечних факторів, в тому числі – фізичних. Саме цим двом аспектам і присвячена дана робота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дослідження виконувалися у двох наукових установах: кафедри трансляційної медичної біоінженерії Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»: науково-технічна робота за державним замовленням «Розроблення методів підвищення біологічної активності харчових продуктів для спеціальних медичних цілей» (№ державної реєстрації – 0122U200933) та низки науково-дослідних програм відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України: «Фізіолого-морфологічна характеристика лікарських макроміцетів та їх біосинтетична активність у культурі» (№ державної реєстрації 0104U009743), «Біологічні властивості сапротрофних макроміцетів в культурі» (№ державної реєстрації 0110U001264), «Біологічні властивості штамів колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ІВК» (№ державної реєстрації – 0115U002001), «Біологічна активність штамів колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки (ІВК)» (№ державної реєстрації 0120U101111), «Колекція культур шапинкових грибів ІВК», а також 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).

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертанткою розроблено наукові основи застосування низькоінтенсивного LED- і лазерного світла та колоїдних розчинів наночастинок металів у біотехнологіях глибинного культивування лікарських макроміцетів для цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності. На основі комплексного дослідження впливу колоїдних розчинів НЧ металів на біосинтетичну активність лікарських макроміцетів за умов глибинного культивування вперше встановлено закономірності їх впливу на синтез міцеліальної маси, біологічно активних речовин (полісахаридів, поліфенолів, меланінів, флавоноїдів), а також антиоксидантної та антимікробної активності міцеліальної маси та культуральної рідини.

Запропоновано нові екологічно безпечні біотехнологічні рішення для цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності лікарських макроміцетів з використанням енергоефективних джерел низькоінтенсивного LED- та лазерного світла з контрольованими спектральними та енергетичними характеристиками, які сприяли підвищенню синтезу міцеліальної маси, полісахаридів, ненасичених жирних кислот, поліфенолів, меланіну, антиоксидантної та антимікробної активності у макроміцетів за умов глибинного культивування.

Вперше одержані нові науково обґрунтовані теоретичні та експериментальні результати та виявлені закономірності комбінованого впливу низькоінтенсивного лазерного світла та колоїдних розчинів НЧ металів на синтез міцеліальної маси та біологічно активних речовин стали основою для створення інноваційних біотехнологій, спрямованих на підвищення ефективності культивування лікарських макроміцетів і оптимізацію їх використання у медичній промисловості.

Теоретичне значення результатів досліджень. Проведені дисертанткою дослідження вносять суттєвий вклад у вирішення фундаментальних питань щодо спектральної та фотокаталітичної чутливості лікарських макроміцетів, а також методів інтенсифікації їх біосинтетичної активності у процесі глибинного культивування з застосуванням екологічно безпечних фізичних факторів. Результати, наведені у дисертації, поглиблюють та розширюють уявлення про фізичні, фізіолого-біохімічні та генетичні механізми, задіяні у формуванні відповіді лікарських макроміцетів на застосування лазерного, LED-світла різного спектрального складу та колоїдних розчинів наночастинок металів. Наукове обґрунтування таких підходів сприятиме прогнозуванню та оптимізації біотехнологічних процесів виробництва цільових продуктів.

Практичне значення одержаних результатів. На основі комплексного дослідження та аналізу морфолого-культуральних особливостей 29 штамів 9 видів 8 родів базидієвих макроміцетів визначено комплекс морфолого-культуральних характеристик для окремих штамів. Ці характеристики дозволяють підтверджувати таксономічний статус чистих культур і забезпечувати контроль чистоти на різних етапах біотехнологічних процесів. За допомогою молекулярно-генетичних методів підтверджено видову приналежність 10 штамів 5 видів з 4 родів, а відповідні нуклеотидні послідовності депоновано в міжнародну базу даних GenBank NCBI. Складено паспорти культур для 15 штамів 9 видів лікарських макроміцетів.

Дисертанткою розроблено методичні підходи для цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності лікарських макроміцетів шляхом модифікації існуючих біотехнологій отримання міцеліальної маси та їх біологічно активних сполук. Це дозволило скоротити терміни культивування та збільшити вихід міцеліальної маси з підвищенням вмістом біологічно активних сполук. Розроблено 3 харчових продукти, проведено гігієнічне регламентування показників їх якості та безпеки, розроблено технічні умови для спеціальних медичних цілей. Розроблено композицію готової форми у вигляді твердих желатинових капсул на основі грибної сировини. Виготовлено дослідні партії та створено проекти інструкцій із застосування.

Структура та зміст дисертації, її завершеність та відповідність зазначеної спеціальності. У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, мета, завдання та логіка постановки експериментів. Вона має традиційну структуру і складається з анотацій (українською та англійською мовами), вступу, огляду літератури, опису експериментальних об'єктів і методів досліджень, опису результатів досліджень, їх обговорення та практичного використання (5 розділів), висновків, списку використаних джерел і додатків. Дисертація викладена на 527 сторінках комп'ютерного тексту, проілюстрована 87 рисунками і 49 таблицями.

У вступі, написаному відповідно до чинних вимог, обгрунтовано актуальність теми, визначено зв'язок роботи з науковими темами, сформульовано мету і завдання роботи, визначено об'єкт і предмет дослідження, наукову новизну та практичне значення, особистий внесок дисертантки, апробацію отриманих результатів, наведено кількість публікацій і обсяг дисертації.

В огляді літератури, серед джерел якого переважають сучасні публікації, проаналізовано сучасний стан і перспективи використання їстівних та лікарських макроміцетів, як продуцентів харчової міцеліальної маси та джерел біологічно активних речовин. Дисертанткою послідовно охарактеризовано поживну цінність біотехнологічно важливих видів грибів, основні ефекти та механізми дії фармакологічно важливих сполук лікарських макроміцетів. Розглянуто та обговорено літературні дані щодо вивчення механізмів фоторецепції. Висвітлено роль джерел штучного світла та застосування НЧ металів в регуляції біосинтетичної активності грибного метаболізму та проаналізовано сучасні тенденції до використання цих фізичних факторів у біотехнологіях культивування грибів. Перший розділ закінчується аналізом можливості застосування колоїдних розчинів НЧ металів та штучного світла як інструменту для цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності макроміцетів.

Розділ 2 «Матеріали і методи дослідження» містить перелік модельних об'єктів – чистих культур базидієвих макроміцетів із Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК). В розділі наведено схеми експериментів та умови їх проведення, описано реактиви, живильні середовища та їх модифікації, а також методики – загально прийняті та розроблені дисертанткою. Важливо відмітити широкий спектр методик, які використовувались в роботі: молекулярно-генетичні та морфолого-культуральні методи, газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот, сканувальної та трансмісійної електронної мікроскопії. Наведено методи визначення антиоксидантної здатності та антибактеріальної активності екстрактів міцеліальної маси та фармакогностичного аналізу грибної сировини.

Описані джерела світла, які використовували для виконання досліджень (когерентного – аргонний іонний газовий лазер; LED-опромінення – система штучного освітлення на базі світлодіодів) та режими їх роботи. Висвітлено метод об'ємного електроіскрового диспергування металів у рідині для отримання наночастинок металів на водній основі. Наведено відомості про кількість повторень при проведенні експериментів, а також методи статистичної обробки результатів та оцінки достовірності виявлених ефектів.

Два перших експериментальних розділі присвячені дослідженню морфолого-культуральних та фізіологічних особливостей біосинтетичної активності біотехнологічно важливих штамів макроміцетів *in vitro*.

У розділі 3 «Морфолого-культуральні особливості біотехнологічно важливих штамів їстівних та лікарських макроміцетів *in vitro*» обґрунтовано, що оскільки чисті культури грибів широко застосовуються у біотехнології та використовуються як модельні об'єкти у фундаментальних мікологічних дослідженнях важливим етапом роботи є верифікація видової належності, особливостей та основних характеристик штамів-продуцентів на вегетативній стадії розвитку. На основі проведеного комплексного дослідження із застосуванням світлового та сканувального електронного мікроскопів складено описи мікоморфологічних ознак 9 видів з 8 родів біотехнологічно важливих видів макроміцетів. Також підтверджено видову приналежність 9 штамів 5 видів 4 родів відділу *Basidiomycota*.

Використовуючи молекулярно-генетичні і морфолого-культуральні методи, аналіз фізіологічних та біохімічних характеристик штамів досліджено та охарактеризовано основні біологічні характеристики вегетативного міцелію штамів базидієвих макроміцетів. Зокрема, для аналізу мікоморфологічних особливостей вегетативного міцелію штамів було проведено секвенування повного внутрішнього транскрипційного спейсера, що включає ділянки ITS1, 5.8S та ITS2 рРНК, а також суміжні ділянки 18S та 28S субодиниць, які оточують ITS. Морфолого-культуральну характеристику досліджених штамів на агаризованих живильних середовищах здійснено як за сукупністю характеристик відповідно до традиційної класифікації P. Stalpers, так і за низкою додаткових параметрів. Окремим пунктом цього розділу є аналіз ферментативної активності у культурах досліджених видів, оскільки ксилотрофні макроміцети виконують важливу екологічну функцію, розкладаючи складні карбоновмісні сполуки, засвоюючи недоступну для інших організмів енергію органічних речовин, що містяться в залишках деревних рослин, і трансформуючи її у форму, доступну для використання іншими організмами. В цілому, таке комплексне дослідження дало змогу виявити нові унікальні властивості та основні характеристики перспективних штамів-продуцентів, що є важливим для подальшого використання штамів у біотехнологічних процесах.

Практичним результатом цього розділу є розробка рекомендацій щодо тривалого зберігання штамів в умовах колекції, складу модифікованих живильних середовищ, які сприяли формуванню плодових тіл для кожного з досліджених видів, та реєстрація штамів у генбанку NCBI GenBank.

Результати розділу опубліковані у 11 статтях та 2-х розділах монографій.

У розділі 4 «Фізіологічні особливості біосинтетичної активності їстівних та лікарських макроміцетів *in vitro*» обґрунтовано необхідність визначення основних фізико-хімічних чинників для регуляції біотехнологічних процесів, підвищення продуктивності культур і забезпечення цілеспрямованої регуляції біосинтетичних процесів. Вирішенню цього завдання і присвячений даний розділ. Дисертанткою проаналізовано результати багатоступеневого скринінгу перспективних для біотехнологічного використання штамів, наведено значення основних фізико-хімічних чинників, які регулюють процеси життєдіяльності досліджених культур та дозволяють ефективно контролювати їхні найважливіші функції.

Досліджено ріст культур на живильних середовищах із вуглецевим та азотним джерелами живлення та за різних значень їх кислотності. Встановлено, що діапазон рН для

активного росту культур варіюється залежно від виду гриба: для штамів 7 видів він коливався від 5,5 до 6,5, а штамів *Sparassis crispa* – від 4,0 до 4,5. Аналіз впливу моно-, ди-, три- та полісахаридів на міцеліальний ріст показав, що найкращими для більшості культур є глюкоза і крохмаль. При цьому дисертантка на основі власних результатів та даних літератури зауважує, що може не існувати універсального живильного середовища, оскільки фізіологічні властивості різних видів грибів суттєво різняться. Також з'ясовано, що з 3-х різних джерел азоту (нітратний, амонійний та органічний) кращим живильним середовищем виявилось середовище із органічними джерелами азоту (аспарагін і пептон).

Аналіз динаміки росту за умов глибинного культивування перспективних штамів показав, що накопичення міцеліальної маси цими видами грибів відповідало загальним закономірностям росту і розвитку грибних організмів, проте виявлена істотна різниця максимального накопичення міцеліальної маси як між 3-ма дослідженими культурами (*Fomitopsis betulina*, *Inonotus obliquus*, *Laricifomes officinalis*), так і між окремими штамми кожної культури. Виявлено штамі із найбільшою кількістю фенольних сполук, як речовин із високою антиоксидантною активністю, в етанольних екстрактах культур *I. obliquus* (IBK 5004) та *L. officinalis* (IBK 1877). У цьому пункті дисертантка також наводить можливі механізми дії різноманітних фенольних сполук, які забезпечують їх високу антиоксидантну активність. Також виявлено штамі IBK 1877 (*I. obliquus*) з високим вмістом меланінів у міцеліальній масі, якій може бути перспективним для застосування у фармацевтичній промисловості завдяки антиоксидантній активності, а також імуномодулювальній та гепатопротекторній дії.

Аналіз антиоксидантної активності етанольних та метанольних екстрактів міцеліальної маси показав, що максимальний ефект знешкодження вільних радикалів спостерігали для етанольних екстрактів міцелію *L. officinalis* та *I. obliquus* на дванадцятую добу культивування. Спираючись на відомі лікувальні властивості цінних видів макроміцетів *H. erinaceus*, *L. officinalis* та *S. crispa* та взявши до уваги можливий зв'язок із вмістом цитокінінів, проаналізовано якісний та кількісний склад гормонів в їх культивованій міцеліальній масі. Виявлено цитокінінові профілі для кожного з цих 3-х видів. Зокрема, у міцеліальній масі *L. officinalis* IBK 5004 були ідентифіковані транс- і цис- форми зеатину, зеатинрибозид, зеатин-О-глюкозид. У міцелії *Hericium erinaceus* було ідентифіковано зеатин, зеатин-О-глюкозид, *S. crispa* – зеатин, зеатинрибозид, іР – ізопентеніладенін.

Наступним етапом роботи було дослідження антибактеріальної активності етилацетатних екстрактів культуральної рідини та водно-етилових екстрактів міцеліальної маси штамів з метою пошуку нових джерел для боротьби із патогенною мікобіотою. В результаті аналізу їх антимікробної активності виявлено 5 штамів зі здатністю до синтезу речовин, які пригнічують ріст окремих грамположитивних та грамнегативних тест-організмів: *I. obliquus* IBK 1877, *H. erinaceus* IBK 977, *P. eryngii* IBK 2035, *L. officinalis* IBK 5004, *L. edodes* IBK 2451. Дисертантка відмічає, що всі ці штами синтезують біологічно активні речовини, здатні долати стійкість до метицилінрезистентного золотистого стафілокока та тест-бактерії *Klebsiella pneumoniae*. На основі отриманих в даному розділі результатів досліджень відібрано п'ять перспективних штамів-продуцентів лікарських макроміцетів, які можуть бути використані для подальших досліджень.

Результати розділу опубліковані у 11 статтях.

У розділі 5 «Фоторегуляція біосинтетичної активності їстівних та лікарських макроміцетів *in vitro*» проаналізовано вплив лазерного синього та LED-світла (синього, зеленого та червоного) на біологічну активність їстівних та лікарських макроміцетів. Встановлено, що опромінення посівного міцелію всіх досліджених видів лазерним та LED-світлом призводило до скорочення лаг-фази, збільшення швидкості росту та кількості накопичення міцеліальної маси за умов глибинного культивування, проте фотоіндукований ефект залежав як від джерела світла, так і від довжини хвилі та від культури інокулюму.

З'ясовано, що застосування синього (лазер та LED) світла сприяло інтенсифікації процесів синтезу міцеліальної маси досліджених видів, а також позитивно впливало на вміст

полісахаридів, жирнокислотний профіль, загальну кількість фенольних сполук, синтез ендомеланіну та антиоксидантну активність екстрактів. Зокрема, у варіантах із застосуванням цього світла виявлена більша кількість α -ліноленової кислоти та інгібування утворення лінолевої кислоти, також відмічено зростання співвідношення гіпохолестеринемічного до гіперхолестеринемічного індексу жирних кислот та зменшення значень індексів атерогенності та тромбогенності, порівняно з контролем та іншими варіантами опромінення. Показано, що у опроміненних синім LED та лазерним світлом, порівняно з контролем, збільшувалась.

Вперше для *H. erinaceus*, *I. obliquus*, *L. officinalis*, *L. edodes* та *P. eryngii* розроблено режими фотостимуляції інокулюму у синьому та червоному спектральних діапазонах, що дозволило підвищити синтез фенольних сполук та антиоксидантну активність екстрактів міцеліальної маси. Виявлено, що зелене світло сприяє синтезу летких ароматичних сполук у видів *H. erinaceus*, *L. officinalis*, *L. edodes*, *P. eryngii*. Встановлено, що у варіантах із опромінення лазерним та LED світлом у синьому та червоному спектрах інгібуюча активність екстрактів культуральної рідини щодо різних тест-культур збільшувалась, порівняно з контролем та з зеленим світлом. В останньому пункті цього розділу надається характеристика та описується фармакогностичне дослідження міцеліальної маси лікарських та їстівних грибів із підвищеною біологічною цінністю розроблених дисертанткою (у співавторстві) харчових продуктів для спеціальних медичних цілей.

Отримані в цьому розділі результати засвідчують, що фотоактивація інокулюму біотехнологічно важливих видів лікарських макроміцетів за умов глибинного культивування може сприяти скороченню тривалості їх культивування та підвищенню синтезу біологічно активних речовин. Це підтверджує можливість використання синього та червоного світла в якості екологічно безпечних стимуляторів для підвищення синтезу біологічно активних речовин та антимікробної активності у процесах глибинного культивування макроміцетів.

Результати розділу опубліковані у 10 статтях, а їх новизна підтверджена патентом України на корисну модель.

В останньому експериментальному розділі 6 «Використання світлового фактору і колоїдних розчинів наночастинок металів для регуляції біосинтетичної активності макроміцетів» охарактеризована розроблена та адаптована авторська методика дослідження впливу НЧ металів та лазерного світла на біосинтетичну активність чистих культур макроміцетів. Представлено результати дослідження впливу колоїдних розчинів НЧ металів на ріст та біосинтетичну активність відібраних штамів та фотокаталітичну активність НЧ після впливу на них низькоінтенсивного лазерного світла за умов глибинного культивування. З'ясовано, що додавання колоїдних розчинів AgHCl , FeHCl , MgHCl до інокуляту стимулювало ріст міцеліальної маси, при чому ефект двох останніх НЧ ефект був вищим, ніж для AgHCl . Виявлено також, що опромінення грибного інокуляту лазерним світлом в живильному середовищі з НЧ знижувало ростову активність міцелію.

За результатами дослідження впливу НЧ на синтез полісахаридів виявлено, що колоїдні розчини пригнічували синтез екзоклітинних полісахаридів для всіх досліджених видів. При цьому ефект залежав від типу НЧ і від виду гриба, зокрема найменший негативний вплив спостерігався для *P. eryngii* IBK 2035 при використанні AgHCl , найбільший – спостерігали для *I. obliquus* при застосуванні FeHCl та MgHCl . В той же час, опромінення лазерним світлом у середовищі з FeHCl та MgHCl сприяло синтезу екзополісахаридів для *H. erinaceus*, *L. edodes*, *P. eryngii*. Зміни відносного вмісту ендополісахаридів на опромінення лазерним світлом та додавання НЧ також мали неодноспрямований характер. Отже, встановлено видо- та штамоспецифічні щодо синтезу полісахаридів зміни видів на додавання колоїдних розчинів наночастинок металів у живильне середовище окремо та разом з опроміненням лазерним світлом.

Аналіз впливу НЧ на вміст внутрішньоклітинних меланінів проведено на одній культурі – *I. obliquus*, як перспективного джерела натурального меланіну. З'ясовано, що всі 3 досліджених НЧ стимулювали синтез цього гормону, при цьому ефект при використанні

AgHЧ та FeHЧ був найбільшим. Опромінення низькоінтенсивним лазерним світлом інокуляту *I. obliquus* у присутності HЧ металів сприяло підвищенню синтезу меланінових пігментів, але у меншій мірі, ніж HЧ.

Результати дослідження впливу HЧ та лазерного опромінення на вміст фенольних сполук показали, що їх дія залежить як від виду гриба, так і від HЧ металів. Виявлено, що найвищі рівні вмісту фенольних сполук були зафіксовані в етанольних екстрактах міцеліальної маси *I. obliquus* та *L. officinalis*, при цьому у першого з них це спостерігали після обробки інокуляту фотоіндукованими MgHЧ, а у другого – за дії AgHЧ, причому їх концентрація зростала під дією синього лазерного світла. Такі зміни фенольних сполук за дії HЧ та лазерного опромінення добре узгоджуються із їх впливом на антиоксидантну активність: вищі показники антиоксидантної активності також спостерігали у зразках *I. obliquus* та *L. officinalis*, отриманих після обробки фотоіндукованими AgHЧ. Дисертантка пояснює виявлені закономірності у впливі HЧ металів та фотоіндукованих HЧ на синтез фенольних сполук та антиоксидантну активність їх здатністю проникати в клітини, специфічними механізмами біохімічної дії та їх оптичними властивостями після фотоіндукції.

Показано, що застосування фотоіндукованих AgHЧ сприяло накопиченню внутрішньоклітинних флавоноїдів у міцеліальній масі *I. obliquus*. Виявлено штами із широким спектром антибіотичної активності проти всіх тест-культур (*H. erinaceus* IBK 977, *L. edodes* IBK 2541, *P. eryngii* IBK 2035) та з високою антибіотичною активністю проти певних видів бактерій. Також встановлено, що етилацетатні екстракти культуральної рідини досліджених штамів мали більш виражений антибактеріальний ефект, в порівнянні з етанольними екстрактами міцеліальної маси. Наночастинки металів ранжовано по зростанню за впливом на антимікробну активність екстрактів культуральної рідини та міцеліальної маси: AgHЧ > FeHЧ > MgHЧ. Отримані результати підтверджують, що комбіноване застосування HЧ металів та лазерного світла відкриває нові можливості для біотехнологічного використання макроміцетів.

Результати розділу опубліковані у 3 статтях та представлені на 3-х конференціях.

У розділі 7 «Практичне використання отриманих результатів» обговорено роль колекцій культур у виборі перспективних штамів грибів для біотехнологічних досліджень та акцентовано на дотриманні всіх вимог щодо відібраних штамів-продуцентів технологічним характеристикам для промислового використання. За результатами досліджень підтверджено, що низькоінтенсивне світло та колоїдні розчини AgHЧ, FeHЧ та MgHЧ можуть бути ефективним інструментом для інтенсифікації технологічних етапів культивування макроміцетів і розробки методів стимуляції їхньої біологічної активності. Показана ефективність вдосконалених в ході дослідження методів інтенсифікації технологічних етапів культивування лікарських макроміцетів на рідких живильних середовищах у динамічному режимі, яка полягає у використанні фотоактивованого інокуляту, отриманого шляхом його опромінення LED- або лазерним світлом. Вперше запропоновано методики використання колоїдних розчинів AgHЧ, FeHЧ, MgHЧ та фотоіндукованих лазерним світлом HЧ для вдосконалення технології культивування грибів-продуцентів, що для підвищення синтезу біологічно активних сполук із вираженими антимікробними властивостями.

Розроблені практичні рекомендації щодо регуляції біосинтетичної активності з метою підвищення синтезу міцеліальної маси та біологічно активних речовин можуть бути застосованими у фармацевтичній та харчовій промисловості, зокрема для створення засобів на основі макроміцетів із покращеними біологічними властивостями.

Ідентичність автореферату та основних положень дисертації. Дисертацію та автореферат оформлено відповідно до вимог МОН України. Автореферат викладено у науковому стилі літературною мовою. Він повною мірою відображає зміст дисертації, структуру і головні положення.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертанткою проаналізовано значну кількість літературних

джерел щодо сучасного стану, перспектив використання та біотехнологій культивування макроміцетів. Ґрунтуючись на аналізі літературних даних, дисертанткою було сформульовано мету та завдання дисертаційної роботи. Робота має послідовну, логічну структуру, базується на значному обсязі експериментального матеріалу, є комплексним і завершеним науковим дослідженням з вагомим фундаментальним і практичним значенням. Основні положення та висновки обґрунтовані достатньою кількістю якісно проведених досліджень.

Достовірність результатів підтверджується адекватністю використання сучасних методів досліджень, статистичною обробкою експериментальних даних і оцінкою достовірності одержаних результатів. Висновки цілком відповідають поставленим завданням та отриманим результатам досліджень.

Достовірність практичних рекомендацій підтверджено патентом України на корисну модель та створенням вітчизняного харчового продукту для спеціальних медичних цілей на основі культивованої міцеліальної маси.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 2 колективних монографії, 15 статей у наукових фахових періодичних виданнях України, 10 статей у наукових періодичних виданнях інших держав (11 з яких у вітчизняних та іноземних журналах, які індексуються у міжнародних наукометричних базах даних Scopus та WoS), та 3 статті – в інших виданнях та 17 тез і матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових конференцій і симпозіумів, що засвідчує належний рівень апробації матеріалів дисертації. Також дисертанткою дисертаційної роботи отримано патент України на корисну модель.

Відсутність порушення академічної доброчесності. У роботі не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації. Використані ідеї та результати досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело, дотримано вимоги норм законодавства про авторське право. Аналіз тексту дисертаційної роботи свідчить про відсутність порушення автором вимог академічної доброчесності. Для всіх публікацій дисертантки у співавторстві зазначено її особистий внесок.

Зауваження, питання та пропозиції до дисертаційної роботи.

Принципових недоліків у дисертації МИХАЙЛОВОЇ Оксани Борисівни не виявлено. При загальному позитивному враженні щодо наукового значення, форми осмислення результатів та їх викладення, є деякі питання та зауваження.

Питання: 1. Чому для дослідження обрані саме ці 3 метали? Чому, наприклад, не цинк, який є кофактором багатьох ферментів, які беруть участь у синтезі білків?

2. Чи не суперечить висновок на стор. 240 «Слід зауважити, що статистично значущих відмінностей між цими двома джерелами світла (лазер та LED) **не спостерігалось**, що свідчить про універсальність впливу синього світла, незалежно від типу джерела» висновок на стор. 314 «Синє лазерне світло **виявилось на 5 – 10 % ефективнішим**, ніж LED-світло, для стимуляції росту та біосинтетичної активності видів *H. erinaceus*, *I. obliquus*, *L. edodes*»?

3. Чи є якась класифікація їстівних грибів за популярністю на світовому ринку за їх потенціалом для терапевтичного застосування?

4. Спеціалісти з фізіології дії гербіцидів зазначають, що в Україні стали з'являтися резистентні до дії гербіцидів бур'яни, дезінфектологи – пишуть про резистентні патогени. І при цьому стверджують, що протягом останнього десятиріччя не з'явилося жодної нової хімічної сполуки для боротьби з патогенами або нового типу гербіцидів. Чи можна очікувати, що наночастинки можуть стати основою для створення речовин з принципово новими властивостями?

Зауваження: 1. Починаючи зі змісту (2.12. Визначення вмісту **флаванонідів** ... , стор. 26) слово «флаваноїди» далі багато разів у тексті зустрічається з помилкою.

2. Підписи на рис. 2.6 дисертації (стор. 131), він же № 3 у авторефераті – англійською.

3. У опису методики визначення вмісту цитокінінів (стор. 140), помилково написано «розмір **пластинок** 5 мкм», замість – частинок.

4. Якщо притримуватись наукової термінології, то міцеліальну масу потрібно представляти на г сухої **маси** (стор. 192 та далі по тексту) або **ваги** (табл. 4.1-4.4, рис. 4.1-4.2), а на г сухої речовини.

5. У деяких графах таблиць (табл. 4.4, 4.5, 4.6, 5.10, 6.2) не витримано принципу однаковості розмірності середніх значень та їх похибки ($56,57 \pm 2,2$; $30,11 \pm 0,2$; $78,21 \pm 0,4$).

6. У таблицях 5.1 і 7.1 – частково повторюються дані.

7. На рис. 6.14 немає істотної різниці варіанту колоїдного розчину наночастинок AgHCl та лазерного опромінення з контролем без HCl та опромінення, хоча позначка вказує на статистично значущі відмінності.

8. Пункт п. 6.1. «Методологія вивчення біологічної ефективності наночастинок металів та лазерного опромінення» краще було б навести у другому розділі.

Проте, в цілому, помилок – граматичних, стилістичних та пунктуаційних – в тексті небагато, тому їх не наведено. Наведені зауваження не є принциповими, не знижують загальної позитивної оцінки та науково-практичної значимості дисертаційної роботи.

Побажання: 1. Бажано було б перед висновками дати узагальнюючу фразу.

2. З огляду на фундаментальну та практичну значимість роботи доцільно за її результатами видати монографію.

Загальна оцінка роботи і висновок. В цілому, за актуальністю, обсягом експериментального матеріалу, новизною, науковим і практичним значенням, рівнем застосованих експериментальних підходів дисертаційна робота МИХАЙЛОВОЇ Оксани Борисівни «Біотехнологічні основи регуляції біосинтетичної активності лікарських макроміцетів за допомогою екологічно безпечних фізичних факторів» є завершеною самостійною науковою працею, яка відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» та вимогам «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2017 р. (в редакції Постанови Кабінету Міністрів України від 3 травня 2024 р. № 507), а її дисертантка – МИХАЙЛОВА Оксана Борисівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – Біотехнологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
проф. н.с. відділу генетичного поліпшення рослин
Інституту фізіології рослин і генетики
НАН України

 Галина ПРЯДКІНА

Підпис Г.О. Прядкіної
Засвідчую:
Начальник відділу кадрів
Інституту фізіології рослин і генетики
НАН України



Надія МАХАРИНСЬКА