

ВІДГУК

офіційного опонента Поєдинок Наталії Леонідівни
на дисертаційну роботу Поліщук Валентини Юріївни

**«Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної
олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill.»**, подану до захисту на
здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю
03.00.20 – біотехнологія

Актуальність теми. Дисертаційна робота Поліщук В.Ю. присвячена розробці біотехнології отримання рибофлавіну та ефірної олії з використанням штаму-продуценту *Eremothecium ashbyi*.

Незаперечним залишається той факт, що отримати рекомендовану для вживання норму вітаміну В₂ лише за рахунок продуктів харчування дуже складно, оскільки лише деякі харчові продукти є багатими джерелами даного вітаміну. Тому пошук шляхів збільшення кількості вітаміну В₂ для потреб людини та тварин є задачею важливою та актуальною. Мікробний синтез отримання рибофлавіну на сьогоднішній день є найбільш дешевим.

Питання утворення мікроорганізмами та грибами рибофлавіну та ароматутворюючих компонентів розглядалося багатьма дослідниками, проте реальна перспектива одночасного отримання рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди, що є затребуваною та однією з найдорожчих олій, залишається актуальною і важливою для України, оскільки їх біотехнологічне виробництво в нашій країні відсутнє.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі промислової біотехнології КПІ ім. Ігоря Сікорського відповідно до теми № 5/2010 «Розробка технології отримання вітаміну В₂ мікробіологічним шляхом» та НДР № 2033п «Створення лінії інноваційних біологічно активних продуктів для медицини, харчової промисловості та сільського господарства», державний реєстраційний номер 0117U002390.

Достовірність і обґрунтованість результатів, наукових положень і висновків. Представлені у дисертації узагальнення та висновки обґрунтовані значним масивом результатів проведених експериментальних досліджень і

тому носять об'єктивний характер. Зокрема, застосовувалися мікробіологічні (культивування аскоміцетних грибів), фізико-хімічні методи для визначення вмісту рибофлавіну, рН, вуглеводів, біомаси. При виконанні досліджень накопичувалася достатня статистична база експериментальних даних та виконувалася їх коректна статистична обробка. Аналіз та інтерпретацію отриманих результатів дисертантка виконувала з залученням відомих літературних джерел, присвячених біологічному синтезу рибофлавіну та ефірних олій, та виконувала їх коректне порівняння з результатами власних досліджень. Це дозволило досягти логічної узгодженості окремих розділів дисертації та сформулювати обґрунтовані висновки дослідження.

Новизна отриманих результатів. За матеріалами дисертаційного дослідження Поліщук В.Ю. отримано ряд нових наукових результатів. Зокрема, *вперше*:

- досліджено динаміку росту, вихід біомаси, накопичення рибофлавіну та ефірної олії обраним штамом-продуцентом *Ermothecium ashbyi* на середовищах з різними джерелами живлення;

- визначено склад та кислотність середовищ, які є сприятливими для росту штаму-продуценту в глибинній культурі;

- автору роботи вдалося встановити оптимальні біотехнологічні параметри для отримання максимального виходу рибофлавіну та ефірної олії:

- за допомогою методів планування експерименту оптимізовано поживне середовище для накопичення рибофлавіну та ефірної олії, що складається з ГФС-10, дріжджового екстракту та пептону, перевірена можливість одночасного отримання цих продуктів;

- вперше науково обґрунтовано та створено біотехнологію отримання рибофлавіну з вітчизняної відновлюваної сировини – глюкозо-фруктозного сиропу, що виготовляється з кукурудзи.

Практичне значення отриманих результатів. Автором запропоновано науково обґрунтовану технологію виробництва рибофлавіну та ефірної олії методом глибинного культивування аскоміцета *Ermothecium ashbyi* на модифікованому середовищі, що в якості джерела карбону містить

перспективну відновлювану сировину – глюкозо-фруктозний сироп, та технологічну схему одночасного отримання рибофлавіну та ефірної олії.

Результати вивчення продуценту та особливостей біосинтезу рибофлавіну покладено в основу розробки лекцій та лабораторних робіт для студентів кафедри промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського та Національного університету «Львівська політехніка».

Повнота використання в роботі наукової літератури у даній галузі. Список використаних літературних джерел включає 176 найменувань, що дозволяє у повному обсязі охарактеризувати сучасний стан розробки даної проблеми у світі.

Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації. Дисертація Поліщук Валентини Юріївни написана у традиційній формі, викладена на 159 сторінках комп'ютерного тексту, а разом з додатками 177 сторінок. Дисертаційна робота містить анотацію, перелік умовних скорочень, вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, п'ять розділів, у яких наведено результати досліджень та їх обговорення, узагальнення результатів, висновки, додатки, список використаних джерел. Робота добре ілюстрована – містить 37 рисунків, 14 таблиць, які допомагають кращому сприйняттю отриманих результатів.

У **вступі** наведено загальну характеристику роботи, обґрунтовано актуальність теми, сформульовані мета і завдання дослідження. Охарактеризовано наукову новизну та практичне значення отриманих результатів. Вказано на зв'язок роботи з науковими програмами установи, в якій виконувалася дисертація. Наведено апробацію отриманих результатів роботи на вітчизняних та міжнародних конференціях та наявні публікації, відзначено особистий внесок здобувача.

У **розділі 1** «Сучасні можливості отримання рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди» дисертанткою розглянуто та проаналізовано літературні дані щодо структури та властивостей рибофлавіну, його застосування в медицині, харчовій промисловості, у сільському господарстві, представлена порівняльна характеристика продуктивності флавіногенних мікроорганізмів, вказано існуючі літературні дані щодо *Eremothecium ashbyi* та перспективи його

використання в біотехнологічних виробництвах з метою отримання рибофлавіну, шляхи його біосинтезу, а також викладено математичні методи оптимізації складу поживних середовищ для біосинтезу рибофлавіну. Розділ також містить інформацію як про традиційні методи отримання ефірної олії троянди так і біотехнологічні можливості її синтезу. Огляд літератури написаний ґрунтовно із залученням значної кількості сучасних вітчизняних та іноземних наукових джерел з досліджуваної тематики.

У **розділі 2** «Матеріали і методи досліджень» наведено відомості щодо об'єктів дослідження, а саме, у роботі було використано *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКПМ F-340, отриманий з Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів. Описано умови культивування штаму, спосіб отримання посівного матеріалу, умови проведення глибинного культивування, дослідження динаміки росту і перевірки життєздатності культури за різних умов збереження, температур, рН. Також представлено методи визначення найсприятливіших умов для накопичення біомаси та рибофлавіну джерел вуглецю, азоту, впливу УФ-опромінення на синтез рибофлавіну, показників, що визначалися в процесі культивування, метод оптимізації складу поживного середовища та методи статистичного аналізу. Раціональний підбір методичних підходів дозволив автору успішно реалізувати основні завдання дисертаційної роботи.

У **третьому розділі** викладено результати експериментального дослідження біологічних властивостей штаму *Eremothecium ashbyi* F-340. Досліджено його морфолого-культуральні властивості та здатність синтезувати рибофлавін, накопичувати його у вакуолях у вигляді кристалів та виділяти в середовище культивування. Визначено динаміку росту продуценту в умовах періодичного культивування. Показано, що накопиченню рибофлавіну передують зниження рН середовища. Максимальний рівень рибофлавіну спостерігається у фазі відмирання. Найбільша кількість ефірної олії синтезується на 3 добу культивування. Розглянуті біологічні властивості *E. ashbyi* показали його перспективність, як продуценту рибофлавіну та ефірної олії.

У **четвертому розділі** представлено результати дослідження, спрямовані на розробку методів підтримки продуцента в фізіологічно активному стані і підвищенню активності посівного матеріалу на етапі відновлення музейної культури. Для підтримки культури *Eremothecium ashbyi* в активному стані, на першому етапі підготовки посівного матеріалу рекомендовано здійснювати підтримуючу селекцію, відбираючи для подальших досліджень найбільш пігментовані колонії продуценту, а у разі втрати ним біосинтетичної здатності - здійснювати ультрафіолетове опромінення посівного міцелію.

Розділ 5 присвячений встановленню фізико-хімічних факторів середовища, що забезпечують максимальну біосинтетичну активність продуценту (рН, інтенсивність перемішування, джерела вуглецевого живлення, нітрогену, комплексні середовища, амінокислоти).

У **розділі 6** продемонстрована можливість використання глюкозо-фруктозного сиропу у біотехнології отримання рибофлавіну та ефірної олії і здійснена оптимізація складу поживного середовища з метою максимального накопичення рибофлавіну продуцентом *Eremothecium ashbyi* за трьома компонентами: ГФС, дріжджовим екстрактом та пептоном. Отримані результати дозволяють запропонувати технологію виробництва рибофлавіну, засновану на глибинному культивуванні аскоміцетного гриба *E. ashbyi* F-340.

Розділ 7 - узагальнюючий, в якому власне і представлена технологія, у якій пропонується одночасне виробництво двох цільових продуктів: технічного рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди. Вдосконалення технології досягнуто за рахунок застосування оптимальних параметрів культивування та модифікованого середовища на основі ГФС-10.

Висновки, які зроблені здобувачем, відповідають меті і завданням дисертації та достатньо обґрунтовані експериментальним матеріалом.

Однак, не зважаючи на приємне враження, дисертаційна робота Поліщук В.Ю. не позбавлена певних **недоліків**:

1. В огляді літератури можна було б не представляти характеристику інших видів мікроорганізмів-продуцентів рибофлавіну, які не використовувалися безпосередньо в дисертаційній роботі;

2. У висновках до розділу 1 не варто було представляти мету роботи і завдання, які треба було вирішити для її реалізації, які раніше були сформульовані у Вступі;

3. Хотілося б почути, чим, на думку дисертанта, або інших дослідників, викликана гетерогенність колоній продуцента, які висівали на агаризовані середовища після тривалого зберігання;

4. В розділі 3 автор пише, що "... розроблені спеціальні методи тривалого зберігання мікроорганізмів, наприклад, під шаром вазелінової олії». Які спеціальні методи? Зберігання культур під вазеліном - відомий метод. Якщо це нові методи, тоді чому цього немає в новизні?

5. У цьому ж розділі, а також в розділі 4, дисертантка представила результати визначення сумарного рівня накопичення рибофлавіну одночасно у культуральній рідині та у міцелії в **мг/г сухої біомаси**. А чому не в мг/дм^3 , як це прийнято і більш інформаційно?

6. На рис. 4.2 «Накопичення рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 після УФ-опромінення» автор на осі абсцис приводить час опромінення УФ, тоді як, з наукової точки зору, правильно приводити дози, тим більше, що вони відомі і вказані в розділі "матеріали і методи». Крім того, на цьому ж рисунку і далі по тексту дисертації, продуцент в середовищі культивування фігурує як культуральна рідина. Це некоректно і вводить в оману - з чим же ми маємо справу? Що використовували в якості контролю - продуцент у середовищі культивування або водна суспензія міцелію без опромінення. Правильно було б використовувати 2 контролю. Наскільки достовірна різниця в ефективності опромінення ВС і продуцента у середовищі культивування (74 і 80%)

7. Яка причина, на думку дисертанта, більш високої ефективності опромінення водної суспензії міцелію? Цікаво було б подивитися, що дало б УФ опромінення активного посівного міцелію, а не після «Відновлення музейної культури»

8. На сторінці 92 дисертант пише, що після УФ-опромінення «Хоча у культуральній рідині накопичувалася велика кількість рибофлавіну, сумарна кількість рибофлавіну у перерахунку на суху біомасу незначна у порівнянні з попередніми дослідженнями». Хотілося б знати з якими дослідженнями? І знову ж таки - а навіщо перераховувати на суху біомасу, а не мг / дм³. Так було б, на мій погляд, наглядніше і легше проводити порівняння. Адже нас цікавить загальний вихід рибофлавіну? Тим більше, що в Додатку Б на всіх рисунках концентрація рибофлавіну в культуральній рідині і біомасі наводиться в мг/дм³.

9. У висновку до розділу 5 бажано було б обґрунтувати перехід до подальших досліджень, представлених в розділі 6.

10. Характеристику глюкозо-фруктозних сиропів можна було не давати окремим підрозділом, так як тут немає експериментальних даних автора дисертації. Логічно було б об'єднати його з наступним підрозділом 6.2 «Застосування глюкозо-фруктозних сиропів в біотехнології рибофлавіну». Табл. 6.1 можна було б не приводити так як дане посилання на ТУ У 15.6-32616426-009: 2005 «Сироп глюкозо-фруктозний»

11. На рисунку 6.1 не зазначена достовірність відмінності дослідних варіантів з контрольним. Так достовірність відмінностей накопичення рибофлавіну на середовищах 1) глюкоза + пептон і ГФС + пептон; і біомаси, на середовищах 2) глюкоза + пептон і пептон + дріжджовий екстракт - не очевидна. Вказівки на це повинні були представлені не тільки в тексті.

12. Висновок 1 - дуже громіздкий. Містить інформацію як про синтез рибофлавіну так і ефірного масла. Логічно було б об'єднати його з 3 висновком («Встановлено, що найбільшому виходу рибофлавіну сприяє використання посівного матеріалу у віці 3-4 діб та у кількості 1%.») і сформулювати 2 окремих висновки про оптимальні умови а) біосинтезу рибофлавіну і б) ефірного масла.

Зроблені зауваження та рекомендації стосуються, в основному, покращення викладення матеріалу, не носять принципового характеру, не знецінюють якість виконаної роботи та не ставлять під сумнів справедливості основних результатів та висновків роботи.

Загальний висновок: даючи оцінку дисертаційної роботи Поліщук В.Ю. слід зазначити, що представлена робота є завершеним науковим дослідженням, яке виконано на сучасному науковому рівні. Вважаю, що робота «Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill.» за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, теоретичним та практичним значенням, відповідає паспорту спеціальності 03.00.20 – біотехнологія, а також вимогам до кандидатських дисертацій, у т.ч. пп. 9 та 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, що дає підстави для присудження її автору - Поліщук Валентині Юріївні наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник,
старший науковий співробітник відділу
клітинної біології і біотехнології
Державної установи «Інститут харчової
біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»

Н.Л. Поєдинок

