

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Поєдинок Наталії Леонідівни на тему: «Біотехнологічні основи інтенсифікації культивування їстівних і лікарських макроміцетів за допомогою світла низької інтенсивності», поданої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (біологічні науки)

Робота, що рецензується, присвячена розробці сучасних методів цілеспрямованої фотоіндукції ростової і біосинтетичної активності грибів-макроміцетів двох відділів - *Ascomycota* та *Basidiomycota*. В якості обґрунтування вибору цих груп грибів для досліджень, автор наводить приклади того, що вони є джерелом біологічно активних компонентів, які в наш час широко використовуються в якості харчових добавок, біопрепаратів для захисту рослин з інсектицидною, фунгіцидною, бактерицидною, гербіцидною і антивірусною активністю. Крім цього, гриби-макроміцети використовуються як продукти дієтичного харчування, а також для потреб косметики. Не дивлячись на те, що на сьогодні накопичений величезний фактичний матеріал з вивчення фоторецепції та фотоморфогенезу грибів, однак, у практиці промислового вирощування грибів низькоінтенсивне світлове випромінювання практично не застосовується. На думку автора це пов'язане з відсутністю інформації з цілої низки питань, які Наталія Леонідівна, в рамках представленої дисертації, береться вирішити.

Вирішення цих питань стане фундаментом для наукового обґрунтування прогнозу одержання грибної біомаси, а також біотехнології перелічених мною корисних для людини сполук, синтетиками яких є гриби-макроміцети.

Виходячи з цього, актуальність представленої до захисту роботи не викликає сумнівів. Не викликає також сумнівів наукова новизна роботи, тому що автору вдалося розробити наукові засади використання майже не вивченого впливу низькоефективного світла в технології вирощування грибів-макроміцетів. Для цього дисертантом розроблено і запропоновано низку високоефективних методів регуляції біосинтетичної активності макроміцетів, а отримані експериментальні дані дозволили запропонувати гіпотезу про пусковий механізм біохімічних реакцій, індукованих низькоінтенсивним світлом і для макроміцетів. Головне досягнення роботи, є те, що вперше експериментально доведено стимуляцію біологічної активності для грибів світлом низької інтенсивності і цей факт розширить уявлення про фундаментальні процеси фоторецепції макроміцетів.

Не менш вагомим у роботі є її практичне значення. Отримані експериментальні дані підтверджені трьома патентами на винахід, чотирма деклараційними патентами і двома патентами на корисну модель. Результати дисертації були представлені на 34 міжнародних і вітчизняних конференціях.

Дисертація побудована за традиційною класичною схемою.

Розділ ВСТУП також має класичну рубрикацію. Зауваження до ВСТУПУ, на наш погляд, є такими:

- мету роботи можна було в сформулювати наступним чином: «... для підвищення ефективності етапів біотехнології лікарських ...», тому, що словосполучення «біотехнологічне культивування» не зовсім вдале;

- стор. 14, у рубриці Методи досліджень розшифровані всі методи: фотобіологічні, мікро- і мікологічні. Тільки невідомо, якими біотехнологічними методами користувався дисертант;

- стор. 16, перший абзац, цитую: «Виявлено достовірно значущі зміни рівня активності ферментів...». Бажано було б вказати, в яку сторону виявлено зміни. Далі на цій сторінці: «Визначена специфіка реакцій макроміцетів ... на опромінення ...». Яка саме специфіка виявлена?

- потребує наукового пояснення факт плодоутворення за дії світла для виду *Agaricus bisporus*.

Перший розділ це ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. Складається з 8 підрозділів і цілком присвячений макроміцетам як об'єтам біотехнології. У першому підрозділі розглядаються загальні питання щодо продукції цими грибами біомаси і її харчової цінності, біологічно активних речовин, які продукуються макроміцетами та їхнім лікувальним цінностям. Найбільш цінною, з нашої точки зору, у цьому підрозділі є інформація щодо морфогенезу макроміцетів, тому що створення високо інтенсивних технологій отримання харчової біомаси і використання її у якості синтетиків БАР неможливе без докладного знання життєвого циклу біологічного об'єкту, без розкриття механізмів, які регулюють певні стадії розвитку гриба, визначення факторів, які впливають на його життєву активність.

У наступному підрозділі розглядаються і аналізуються питання і тенденції інтенсивного культивування їстівних і лікарських грибів. Окремо аналізуються переваги і недоліки твердофазного культивування і глибинної ферментації.

Далі дисертант аналізує фактори, які впливають на накопичення біомаси, а також біосинтетичну активність макроміцетів. Розглядаються найбільш ефективні джерела вуглецю, нітрогену, фосфору, калію, сірки і магнію при глибинному культивуванні. Звертається увага на роль стимуляторів

накопичення біомаси і синтетичної активності, на роль вітамінів, рН і аерації на вихід кінцевого продукту.

У наступному підпідрозділі розглядаються проблеми фотоморфогенезу і механізми фоторецепції у грибів. Автор стверджує, що більшість макроміцетів не є фототрофними організмами, однак світло слугує важливим морфогенетичним фактором, але світло використовується грибами, на відміну від рослин, не як джерело енергії, а як джерело інформації.

На думку дисертанта, дослідження механізмів фотореакцій грибів є важливою задачею з фундаментальної і практичної точки зору, тому що знання механізмів фоторецепції продуценту - це шлях до цілеспрямованої фоторегуляції його біосинтетичної активності. І саме ці проблеми автор дисертації аналізує у п'ятому підпідрозділі і робить висновок на користь використання світла у регуляції морфогенезу.

Далі розглядається і аналізується роль джерел штучного світла у промисловому вирощуванні грибів. Дисертант наголошує на тому, що звичайні джерела світла, маючи широкий спектр довжин хвиль, не є ефективними. Ефекти спектральної залежності фотореакцій грибів стало можливим виявляти з розвитком технологій синіх, зелених і червоних світловипромінюючих діодів.

Перш, ніж аналізувати досягнення світової науки щодо фоторегуляції метаболізму грибів, дисертант нагадує важливу річ про те, що каротиноїди, виконуючи захисну функцію в організмі людини і тварин, самотійно їх не синтезують і цей факт є головним, чому вони отримуються у величезних масштабах як за допомогою хімічного, так і біологічного синтезу. Що стосується біосинтезу каротиноїдів грибами, то автор приводить декілька прикладів надсинтезу різних пігментів зигоміцетами саме за допомогою світла. Світло також стимулює синтез полісахаридів, нуклеїнових кислот і вторинних метаболітів у різних видів грибів.

Останній підпідрозділ огляду літератури, на наш погляд, підсумовує всю наведену інформацію. Однак, на початку дисертант стверджує, що в розробці методів впливу світла на гриби домінує емпіричний підхід. Це пов'язане з відставанням теоретичного і практичного обґрунтування механізму взаємодії низькоінтенсивного випромінення з організмом гриба. Існуюча на даний період часу наукова інформація свідчить про позитивний регуляторний вплив світла на морфогенез і метаболізм грибів різних таксонів.

Наступний розділ дисертації – це ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Він викладений досить докладно і кваліфіковано. У всякому разі, прочитавши його, можна, при наявності відповідних знань, всі запропоновані методи досліджень відтворити.

Дисертація містить шість розділів власних досліджень.

В рамках першого підрозділу дисертант вивчав процент і швидкість пророщування спор семі видів базидіоміцетів під впливом низькоінтенсивного когерентного і некогерентного світла різної довжини хвиль в безперервному та імпульсному режимах, а також вплив зазначених варіантів опромінення на розвиток моноспорових ізолятів грибів. В обох випадках опромінення було в деякій мірі ефективним, однак, більш ефективним відносно моноспорових ізолятів.

Зауваження до підрозділу наступні:

- стор. 114; у тексті є таке словосполучення: «...спори володіють значною протипухлинною активністю ...». Мабуть не спори, а екстракти зі спор.

- стор.115; у тексті: «... світло можна використовувати як екологічно чистий стимулятор біологічної активності спор». Що, на думку дисертанта, більш важливо у даному випадку: що світло є стимулятором, чи екологічно чистим фактором стимуляції?

- стор. 116; у тексті: « ... ступінь пророщування спор коливається від 10^{-6} до 13,6%». Чи не є величина 0,000001% нескінченно малою, щоб посылатися на неї?

- стор. 120; мова йде про пришвидчення пророщування спор для різних штамів у 10, 100 і 100000 разів. У 10 разів я ще можу зрозуміти. А в 100000 разів як вдалося встановити?

- стор. 121; у тексті: «... базидіоспори більшості видів ... більш чутливі до когерентного світла...». Чутливість чогось до чогось – широке поняття, тому краще було б написати: «... когерентне світло більш ефективне, ніж некогерентне...».

- стор.121; хотілося б почути від дисертанта власну думку, чому когерентне світло, на відміну від некогерентного більш ефективне: через більш глибоке проникнення у клітину, чи через просторову неоднорідність лазерного поля? З тексту роботи це незрозуміло.

У рамках наступного підрозділу дисертант встановив за якими закономірностями відбувається фотостимуляція вегетативного міцелію макроміцетів на різних стадіях морфогенезу і як і у що трансформуються фотоіндуковані зміни.

За даними експериментів зроблено висновок, що макроміцети, що досліджуються, за чутливістю до світла в зеленому діапазоні довжин хвиль, було розділено на дві групи. Це пояснюється різною будовою їхньої фоторецепторної системи. Однак, Наталія Леонідівна відмічає і деякі закономірності: наприклад, по-перше, найбільш чутливими до дії світла є стадії пророщування спор, розвитку моноспорових ізолятів і вегетативного міцелію,

крім видів роду *Morchella*, по-друге, когерентне світло індукує додаткову стимуляцію ростових процесів.

Питання і зауваження щодо підрозділу є такими:

- що мається на увазі під словосполученням «світло низької інтенсивності різної когерентності»?

Після того, як дисертант визначився з найбільш ефективними параметрами активації посівного матеріалу для видів і штамів грибів, наступним кроком було встановлення ефективності використання міцелію для отримання біомаси, тобто, який потрібен оптимальний об'єм посівного матеріалу для отримання максимального ефекту накопичення. Як показали дослідження, міцелій всіх макроміцетів, який опромінювався в оптимальному режимі, був достовірно активнішим відносно неопроміненого. Крім цього, дисертанту вдалося встановити, що зменшення кількості активованого інокулюму сприяє зростанню стимулюючого ефекту.

Дуже важливим є отримання інформації стосовно того, чи зберігається фотоіндукована активність посівного міцелію протягом певного часу зберігання та при пересівах, тобто, яка динаміка фотоіндукованої активності посівного міцелію протягом часу зберігання та при пересівах. Як свідчать дані експериментів, що відображені на рис. 3.7, зниження індукованої активності посівного міцелію починається в перші 24 години збереження для всіх макроміцетів, а достовірне зниження активності для *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, *Inonotus obliquus* і *Lentinus edodes* вже в перші 24 години.

Що стосується встановлення динаміки активності при пересівах, то виходячи з рисунку 3.8, рівень активності міцелію при перших двох пересівах достовірно не зменшувався.

Загальне зауваження до розділу 3 є таким: на нашу думку, розділ перевантажений елементами огляду літератури.

Дисертантом встановлено, що низькоінтенсивне світло стимулює розвиток спор і міцелію у базидіоміцетів. Наступна серія експериментів покликана встановити, які фактори впливають на реалізацію фотостимулюючого ефекту в процесі культивування грибів. Спочатку було встановлено вплив способу культивування на ростову активність. Як виявилось, для отримання найбільшого стимулюючого ефекту від опромінення, глибинне культивування є більш переважним.

Наступним фактором впливу на ростову активність макроміцетів є концентрація глюкози. Експерименти показали наявність залежності фотоіндукованої стимуляції росту макроміцетів та накопичення біомаси від концентрації глюкози в середовищі, при чому, найбільш ефективною була концентрація у 10 г/л.

Наступний крок у роботі - з'ясування можливостей використання світла низької інтенсивності для інтенсифікації технологічних етапів отримання біомаси макроміцетів. Це завдання виконано в рамках 5 розділу дисертації. Він складається з декількох підрозділів і перший з них присвячений динаміці накопичення біомаси при глибинному культивуванні. Дисертант показав, що опромінення посівного матеріалу призводить до скорочення лаг-фази, зростання швидкості росту культури, що призводить до скорочення терміну культивування на 2-4 доби.

Оскільки, за даними багатьох дослідників, зростання біомаси, як правило, супроводжується зростанням синтезу екзо- і ендopolісахаридів, а також деяких інших сполук, то автором дисертації було запропоновано визначити вплив опромінення на синтез цих речовин. Що стосується полісахаридів, то було встановлено, що опромінення посівного міцелію когерентним і некогерентним світлом сприяло збільшенню синтезу полісахаридів тільки у *G. lucidum* і *L.edodes*.

Опромінення також значно впливало на процентне співвідношення вуглеводів в ендо- і екзopolісахаридах і, відповідно до характеру фотоіндукційної зміни співвідношення їхніх основних мономерів у полісахаридах, досліджувані види гриби дисертант розділив на дві групи *G. lucidum* і *L.edodes* (базидіоміцети) і *C. sinensis* і *C. militaris* (аскоміцети). У перших двох активність посівного міцелію при поверхневому культивуванні проявлялась у збільшенні процентного вмісту галактози та зниженні рівня маннози, при глибинному – зворотне співвідношення цих вуглеводів. У других двох – дисертант виявив зменшення частки галактози при поверхневому культивуванні та маннози – при глибинному культивуванні.

Наступний підрозділ присвячено експериментальному підтвердженню висунутої дисертантом гіпотези стосовно того, що одним з механізмів, який забезпечує здатність грибів до фоторецепції світла, є відповідні зміни в їхньому жирнокислотному профілі та в ступені ненасиченості клітинних ліпідів. Експериментальні дослідження дозволили встановити загальну тенденцію до зниження коефіцієнта ненасиченості жирних кислот у міцелії. Однак, вміст ненасичених кислот залишається вище насичених.

Зауваження до підрозділу таке: перевантаження інформацією яка схожа з оглядом літератури.

Далі дисертант вивчав, як впливає світло на синтез меланінів та ферментативну активність меланінвмісного гриба *I. obliquus*. Отримані дані дозволили зробити висновок, що опромінення цього макроміцету синім і червоним когерентним світлом є оптимальним для стимуляції росту міцелію,

синтезу меланіну, збільшення внутрішньо- і позаклітинної активностей тирозинази, поліфенолоксидази, а також позаклітинної каталази.

В рамках підрозділу 5.7 дисертант вирішував питання індукції антимікробної активності макроміцетів. Отримані експериментальні дані дозволили дисертанту встановити, що, по-перше, низькоінтенсивне світло з лазерних та світлодіодних джерел здійснює значний вплив на синтез антимікробних компонентів *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum* і *G. applanatum*, по-друге, короткострокове опромінення посівного міцелію в червоному та синьому діапазонах довжинах хвиль сприяло скороченню періоду культивування до появи антимікробних сполук, по-третє, когерентне світло володіло більшим стимулюючим ефектом порівняно з некогерентним, по-четверте, в усіх варіантах дослідів ефективність імпульсного світла була достовірно вище безперервного.

Предостанній розділ експериментальних досліджень присвячений інтенсифікації технологічних етапів твердофазного культивування макроміцетів.

Отже, спочатку дисертант встановив динаміку розвитку макроміцетів на агаризованих поживних середовищах стверджуючи, що збільшення лінійного росту міцелію не завжди є достовірним показником ефективності дії світла і активності посівного матеріалу, тому що не враховується висота і щільність міцелію. Виходячи з цього, пропонується вираховувати, крім швидкості лінійного росту ще й ростовий коефіцієнт. Загальний висновок: світло низької інтенсивності у червоному і зеленому діапазонах скорочувало обростання субстратних блоків *L. edodes* на 20 діб, у синьому – на 30 діб; формування плодоношення починалося раніше на 35-40 діб при опроміненні синім світлом, на 30 діб – червоним, та на 10-15 діб – зеленим.

Дисертантом також встановлено, що передпосівна обробка зернового міцелію світлом знижує кількість посівного міцелію, при наймі, в два рази зі збільшенням врожайності плодівих тіл, при чому, найбільш ефективною дозою опроміненого міцелію є мінімальна доза. Крім цього, встановлено, що НИЛИ з різними спектральними характеристиками діє пролонговано.

Зауваження до підрозділу: на рис. 6.10 і 6.12 відсутня розмірність по горизонтальній осі.

Останній, 7 розділ. «Практичне використання отриманих результатів». Розділ складається з декількох підрозділів, які присвячені розробленим автором рекомендаціям щодо використання оптимальних режимів фотоактивації проростання базидіоспор і росту моноспорівміх ізолятів, фотоактивації посівного міцелію в технологіях глибинного культивування, фотоактивації посівного міцелію для стимуляції синтезу полісахаридів, фотоактивації посівного міцелію для стимуляції біосинтетичної активності, фотоактивації

посівного міцелію для стимуляції антимікробної активності, і, нарешті, фотоактивації посівного міцелію для інтенсифікації технологічних етапів твердофазного культивування. Однак, на наш погляд, назва розділу не дуже вдала.

Заключення. У цьому розділі дисертант намагається узагальнити власні дослідження і обговорити їх з точки зору даних інших дослідників.

Висновки. На початку міститься узагальнюючий висновок. І, на наш погляд, 5 висновок починається не зовсім вдало: «З'ясована динаміка ...».

Список літератури складається з 673 найменувань, десята частина з яких – власні публікації; більшість найменувань є сучасними.

За результатами дисертації опубліковано 73 робіт, включаючи 37 статей (з них 21 стаття у фахових виданнях), 1 розділ у монографії, 3 патенти на винахід, 4 деклараційні патенти, 2 патенти на корисну модель і 26 тез доповідей на конференціях різного рівня.

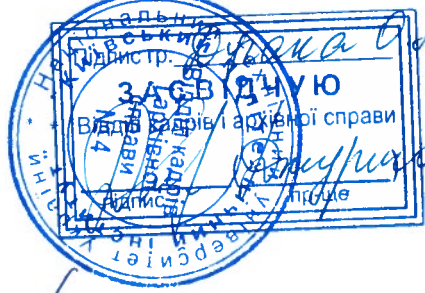
Автореферат дисертації повністю відповідає змісту дисертації.

Зроблені зауваження не є принциповими, носять дискусійний характер.

ЗАКЛЮЧЕННЯ. Дисертаційна робота Поєдинок Наталії Леонідівни на тему: «Біотехнологічні основи інтенсифікації культивування їстівних і лікарських макроміцетів за допомогою світла низької інтенсивності», поданої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія є закінченою науково-дослідною роботою, в якій представлені принципово нові, науково обґрунтовані експериментальні дані. Зроблені автором роботи висновки містять наукову новизну і високу достовірність, результати роботи повністю опубліковані в фахових наукових виданнях

За актуальністю розв'язуваних завдань, новизною отриманих результатів, теоретичною й практичною цінністю, обґрунтованістю висновків дисертаційна робота повністю відповідає вимогам ДАК України «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань» щодо докторських дисертацій, а її автор заслуговує на присвоєння наукового ступеня доктора біологічних наук за вище вказаною спеціальністю.

Декан факультету
біотехнології і біотехніки
Національного технічного
університету «КПІ»,
доктор біологічних наук, проф.


Дуган О.М.