Відгук офіційного опонента на дисертаційну роботу Радченко Марини Михайлівни «Отримання штаму-продуценту *Bacillus subtilis* з підвищеним накопиченням рибофлавіну», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – біологія

Актуальність теми.

Рибофлавін (вітамін В2) є одним із важливих ростових факторів. Добова потреба людини складає приблизно 2 мг. Дефіцит у кормових раціонах тварин веде до порушення обміну речовин, затримки росту, погіршення засвоєння амінокислот і жирів, послаблення зору, дерматозів, зниження продуктивності і використання поживних речовин у кормах та їжі. В Україні виробництво рибофлавіну відсутнє. У світі виробляється близько 6500 тон вітаміну В2. Приблизно 60 % загального виробництва використовується в сільському господарстві як добавка до кормів, решта 40 % – в медицині, як компонент полівітамінних сумішей та лікарських препаратів.

В останні роки спостерігається заміщення хімічного синтезу рибофлавіну біотехнологічним із застосуванням аскоміцетного гриба *Ashbya gossypii*, генно-інженерних штамів бактерії *Bacillus subtilis* та дріжджів *Candida famata*. Мікробний синтез дозволяє заощадити кошти та зменшити енергетичні затрати. Тому дисертаційна робота Марини Михайлівни Радченко, яка присвячена отриманню штаму-продуценту рибофлавіну *Bacillus subtilis* з підвищеним накопиченням є актуальною та перспективною.

Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами. Дисертаційна робота виконана в Державній установі «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» в рамках відомчої тематики лабораторії промислової та харчової біотехнології «Створення штамів надпродуцентів вторинних метаболітів (амінокислот, спиртів, вітамінів)» (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U101489).

Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, сформованих у роботі. Дисертація Марини Радченко є завершеною науковою роботою, що містить всі необхідні структурні елементи від обґрунтування актуальності та стратегії дослідження, до аналізу отриманих результатів та висновків. Частини дисертаційної роботи викладені послідовно та логічно зв'язані між собою. Наведено обґрунтування для вибору кожного методу дослідження, всі експериментальні дані супроводжуються відповідним аналізом. Експериментальні результати було опрацьовано з використанням загально прийнятих методів статистичної обробки даних.

Також було проведено порівняння отриманих результатів з даними, описаними у світовій літературі іншими дослідниками. Виходячи з узагальнення результатів дисертації, було показано, що мета дисертаційної роботи була повністю досягнута в ході виконання дослідження, а дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною працею. Завершується робота вичерпними розгорнутими висновками, які логічно описують отримані результати та відображують наукове та практичне значення дисертаційної роботи.

Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях. Ключові положення дисертаційної роботи було висвітлено у наукових працях дисертанта. За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, серед яких 4 статті у наукових фахових виданнях, включених на дату опублікування до переліку наукових фахових видань України; 1 стаття у періодичному науковому виданні, проіндексованому у базі даних Scopus, 8 тез доповідей наукових конференцій. Наукові публікації за темою дисертації відповідають чинним вимогам законодавства України.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності. У дисертаційній роботі чітко та науково коректно сформульовано мету, яка відображається у поставлених завданнях, визначено об'єкт та предмет роботи. Вичерпно обґрунтовано актуальність поставленої проблеми та використання тих чи інших експериментальних методів. Викладення експериментального матеріалу структурно та змістовно відповідає поставленим завданням.

Дисертація складається з анотації, вступу, восьми розділів, висновків, списку використаних джерел і додатків. Робота викладена на 151 сторінці тексту. Дисертація містить 39 рисунки, 13 таблиць, чотири додатки. Список використаних джерел містить 157 найменувань.

Огляд літератури обґрунтовує актуальність пошуку нових штамів-продуцентів рибофлавіну та описує сучасні методи для збільшення накопичення цільового продукту. Особливу увагу дисертант приділяє проблемам та перспективам використання мікроорганізмів роду *Bacillus* для вирішення описаної актуальної проблематики.

Розділ «Матеріали та методи» містить вичерпний та детальний опис матеріалів та методів використані в ході експериментального дослідження. Так, описано процеси виділення нових штамів-продуцентів, середовища для їх культивування та методи їх ідентифікації, культивування та визначення накопичення рибофлавіну. Окремо описано методику культивування *Bacillus subtilis* у біореакторі 'Sartorius Biostat B TWIN' та визначення накопичення вітаміну B2 у культуральній рідини за допомогою флуориметра і спектрофотометра.

В розділах 3-7 (експериментальна робота) описано виділення з природних джерел та ідентифікацію мікроорганізму продуценту, дослідження його фізіологічних та біохімічних особливостей, встановлення родової і видової приналежності, а також зберігання. Досліджено умови культивування отриманого штаму-продуценту рибофлавіну, вплив терміну культивування, pH, відсотку внесеного інокуляту, джерела вуглецю на накопичення цільового продукту. Описано інтенсифікацію накопичення рибофлавіну у культуральній рідині за допомогою удосконалення штаму *Bacillus subtilis* методами фізичного (ультрафіолет) та хімічного (за допомогою N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіну) мутагенезів. Особлива увага приділяється масштабуванню та культивуванню в біореакторі 'Sartorius Biostat B TWIN', що є першою ланкою у для подальшого промислового виробництва. Всі розділи дисертаційної роботи завершуються проміжними підсумками, які логічно відповідають поставленим завданням.

Розділ «Узагальнення отриманих результатів» містить аналіз отриманих результатів та їх обговорення. Наведено порівняння отриманих результатів із сучасними світовими розробкам у галузі отриманні нових штамів-продуцентів рибофлавіну та його виробництва.

У висновках розкрито як наукове, так і практичне значення дисертації.

Ознайомлення з текстом автореферату дисертації дає підстави стверджувати, що за структурою та змістом він відповідає вимогам, що висуваються МОН України. У тексті відображено основні положення, зміст, результати і висновки здійсненого Радченко Мариною Михайлівною дисертаційного дослідження.

Наукова новизна роботи. У дисертаційному дослідженні вперше виділено та селекціоновано вітчизняні штами-продуценти рибофлавіну *B. subtilis* IMB B-7797 (IFBG MK-2), *B. subtilis* IFBG MK-1A та *B. subtilis* IFBG NTG2. Визначено нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК виділеного штаму *B. subtilis* IMB B-7797 та проведено його філогенетичний аналіз. Секвеновану послідовність гена 16S рРНК штаму *B. subtilis* IMB B-7797 було зареєстровано в базі даних GenBank за реєстраційними номерами MK880455 і MK880456. Також у дисертаційній роботі за допомогою ультрафіолотевого (УФ) мутагенезу удосконалено штам (*B. subtilis* IFBG MK-1A) та хімічного мутагенезу з використанням N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіну отримано клони з підвищеним накопичення рибофлавіну. Для отриманих штамів-продуцентів рибофлавіну визначено оптимальні технологічні параметри культивування.

Практичне значення одержаних результатів. Здобувачем отримано штами-продуценти рибофлавіну *B. subtilis* IMB B-7797, *B. subtilis* IFBG MK-

1А та *B. subtilis* IFBG NTG2, які внесено до «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для сільськогосподарської та промислової біотехнології» Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України». Культуру *B. subtilis* IMB B-7797 депоновано в «Національному Депозитарії мікроорганізмів» Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Показана ефективність масштабування за культивування штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А в біореакторі 'Sartorius Biostat B TWIN' з періодичним підживленням, яка призводила до збільшення накопичення рибофлавіну на 65 % у порівнянні з накопиченням рибофлавіну в колбах.

Зауваження та побажання.

1. В результатах та обговоренні часто трапляються матеріали методичного описового плану, які доцільно розміщувати в розділі 2 «Матеріали та методи дослідження».
2. Базуючись на результатах науково-дослідної роботи автором доцільно було б відобразити практичний вихід штамів-продуцентів і біотехнологічних розробок у вигляді науково-практичних рекомендацій або технологічних регламентів.
3. У розділі «Методи дослідження» для молекулярно-генетичних методів, зокрема для секвенування, не зазначено методичні деталі, які мають значення.
4. Немає пояснення стосовно вибору концентрації хімічного мутагену, яку використовували у роботі.
5. Для приготування середовищ використовували дистильовану воду, але за масштабування у біореакторі – водопровідну, і відсутні пояснення чи дослідження впливу цього фактору на накопичення рибофлавіну.
6. На жаль, немає пояснення щодо причин збільшення накопичення рибофлавіну в індукованих УФ та хімічним мутагенезом клонах.
7. Дисертація містить низку пунктуаційних помилок, лабораторного жаргону та використання невиправданих скорочень і невдалих виразів.

Однак, зазначені зауваження суттєво не впливають на загальне позитивне враження від роботи та мають в тому числі дискусійний характер. Загалом дисертаційна робота написана на достатньо високому науковому рівні.

Загальний висновок. Таким чином, дисертаційна робота Радченко Марини Михайлівни «Отримання штаму-продуценту *Bacillus subtilis* з підвищеним накопиченням рибофлавіну» являє собою закінчену науково-дослідну роботу, яка містить рішення актуальних завдань щодо виділення культури роду *Bacillus* з природних джерел та отримання штаму-продуценту з підвищеним

накопиченням рибофлавіну. Актуальність обраної проблеми, високий методичний рівень проведених досліджень, наукове й практичне значення отриманих результатів дозволяє вважати, що дисертаційна робота Радченко М.М. відповідає спеціальності 091 – «Біологія» та вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії, а саме пунктам 6, 7, 8 і 9 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової Вченої рада закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою КМУ від 12.01.2022 р. № 44. На підставі вищевикладеного, вважаю, що Радченко Марина Михайлівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії галузі знань 09 «Біологія», зі спеціальності 091 «Біологія».

Офіційний опонент:
Декан факультету біомедичної інженерії
Національного технічного університету
України «Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського»,
доктор біологічних наук, професор Олександр ГАЛКІН

Підпис д.б.н., проф. Олександра Галкіна засвідчую:
Учений секретар Національного технічного університету
України «Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського» Валерія ХОЛЯВКО