

ВІДГУК

офіційного опонента, кандидата біологічних наук, доцента,
доцента кафедри біології рослин Навчально-наукового центру «Інститут біології та
медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Джаган Вероніки Володимирівни

на дисертаційну роботу

Бондарук Світлани Володимирівни

«Біотрансформація біологічно активних речовин чистими культурами базидієвих
грибів», подану на здобуття ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія»
за спеціальністю 091 «Біологія»

Ступінь актуальності обраної теми. Сучасний розвиток біотехнології, фармацевтики, медицини та харчової промисловості зумовлює зростаючу потребу в розробленні ефективних, екологічно безпечних і економічно доцільних методів одержання нових біологічно активних речовин та їх похідних. Особливий науковий і практичний інтерес становлять дереворуйнівні базидієві гриби, що характеризуються високою ферментативною активністю та значним біокаталітичним потенціалом. Водночас механізми біотрансформації біологічно активних сполук, специфічність ферментативних систем окремих видів базидіоміцетів і закономірності утворення продуктів біоконверсії залишаються недостатньо вивченими.

У цьому контексті дослідження процесів біотрансформації біологічно активних речовин чистими культурами базидієвих грибів, ідентифікація продуктів біоконверсії та оцінка їх біологічної активності є своєчасним і актуальним науковим завданням, що має як фундаментальне, так і прикладне значення для розвитку мікології, біотехнології, біохімії та створення нових екологічно безпечних біотехнологічних процесів одержання цінних біологічно активних сполук для фармацевтичної, медичної та харчової галузей.

Отже, обрана С.В. Бондарук тема дисертаційної роботи має важливе теоретичне та практичне значення, а її актуальність не викликає сумнівів.

Оцінка обґрунтованості наукових результатів дисертації та їх достовірності. Наукові положення, наведені в дисертації Бондарук С.В., є належним чином обґрунтованими та достовірними. Це підтверджується чіткою логікою побудови дослідження, відповідністю використаних методів поставленим метам і завданням, а також достатнім обсягом експериментального матеріалу. У роботі застосовано сучасні мікологічні, молекулярно-генетичні, біотехнологічні, біохімічні та фізико-хімічні методи досліджень, що забезпечило комплексний підхід до вивчення процесів біотрансформації біологічно активних речовин чистими культурами базидієвих грибів. Отримані результати є статистично

обробленими, належно інтерпретованими та узгоджуються з сучасними науковими уявленнями і даними літератури. Висновки кваліфікаційної наукової праці логічно випливають із отриманих результатів, а поставлені завдання повністю реалізовані в межах проведеного дослідження.

Значний обсяг опрацьованого матеріалу, використання сучасних експериментальних методів дослідження, застосування статистичних методів аналізу та апробація результатів у наукових виданнях і на міжнародних конференціях свідчать про високий рівень достовірності отриманих результатів та їх відповідність сучасним вимогам до дисертаційних досліджень.

Аналіз структури дисертації. Дисертація Бондарук С.В. має чітку, логічно вибудовану структуру та відповідає загальноприйнятим вимогам до кваліфікаційних наукових праць у галузі біології. Робота складається зі вступу, десяти розділів, висновків, списку використаних джерел, який містить 368 посилань, та двох додатків. Загальний обсяг роботи складає 210 сторінок. Основна частина дисертації викладена на 127 сторінках. Робота добре проілюстрована 32 рисунками та 15 таблицями.

У *вступі* традиційно висвітлено актуальність теми, сформульовано мету та завдання, визначено об'єкт, предмет дослідження, зазначено основні методи дослідження, наведено відомості про наукову новизну та практичне значення отриманих результатів. Також подано інформацію про особистий внесок здобувача, дані щодо апробації результатів дисертації тощо.

Перший розділ має оглядовий характер і складається з чотирьох логічно пов'язаних підрозділів, які формують належне теоретичне підґрунтя для подальших досліджень. Ці підрозділи присвячені аналізу змісту та сучасній інтерпретації терміну «біотрансформація» і суміжних понять, таких як біодеградація, біоремедіація та ксенобіотики, особливостям біотрансформації ксенобіотиків у бактерій, одноклітинних водоростей та грибів. Окрему увагу приділено ролі ферментів дереворуйнівних грибів у біотрансформації ксенобіотиків та використанню цих грибів для біотрансформації різних типів ксенобіотиків – пестицидів, фармацевтичних інгредієнтів, зокрема антибіотиків, протизапальних речовин, антидепресантів тощо.

Загалом перший розділ свідчить про ґрунтовне опрацювання автором літературних джерел, дозволяє об'єктивно оцінити сучасний стан досліджуваної проблеми та переконливо обґрунтовує доцільність проведення досліджень, спрямованих на вивчення біотрансформації ксенобіотиків міцелієм різних видів базидієвих грибів, результати яких мають як фундаментальне, так і прикладне значення.

У *другому розділі* детально охарактеризовано матеріали та методи дослідження. Для виконання експериментальної роботи було використано міцелій

9 штамів 5 видів дереворуйнівних базидієвих грибів, виділених з плодових тіл, що росли на хвойних породах дерев, представлених у Колекції культур шапинкових грибів ІВК. Автором наведено відомості про реактиви, живильні середовища, протокол всіх етапів екстракції загальної ДНК із міцелію обраних штамів грибів, описана методика кріозберігання міцелію базидієвих грибів, отримання інокулюму для глибинного культивування міцелію з подальшою оцінкою динаміки накопичення біомаси, а також етапи та методи дослідження біотрансформації ксенобіотиків.

Третій розділ містить результати молекулярно-генетичних досліджень використаних в роботі культур грибів. На основі різних ядерних локусів, зокрема ITS-регіону ядерної рДНК та генів, що кодують другу субодиницю РНК-полімерази (RPB2) здійснено верифікацію досліджених штамів. Для двох штамів *Ganoderma* автором було проведено додаткові молекулярні дослідження із використанням специфічних для цього роду праймерів. Таким чином, було підтверджено видову приналежність восьми штамів базидієвих грибів, зокрема, штамів 1848 та 2566 були переідентифіковані як *Ganoderma sichuanense*. Суттєвим внеском автора у мікологічну науку є депонування нуклеотидних послідовностей верифікованих штамів до бази даних GenBank.

Четвертий розділ присвячений дослідженню накопичення міцеліальної біомаси штамів грибів в динаміці при глибинному культивуванні. Результати цього розділу продемонстрували штамову специфічність показників накопичення біомаси при глибинному культивуванні на рідкому живильному середовищі ГПД та дозволили автору визначити оптимальний час для внесення у культуральну рідину ксенобіотиків задля оцінки їх подальшої біотрансформації. Важливим науковим результатом цього розділу є встановлення позитивного впливу додавання лецитину до складу живильного середовища на накопичення біомаси *Laricifomes officinalis*, для якого характерна повільна швидкість росту під час глибинного культивування. Ці дані є абсолютно новими та можуть бути використані для оптимізації умов культивування цього цінного лікарського гриба.

У п'ятому розділі автор поставила за мету визначити оптимальний метод довготривалого зберігання чистих культур обраних штамів базидієвих грибів на різних субстратах та оцінити відновлення життєдіяльності міцелію після кріозберігання. В результаті проведених досліджень було вивчено вплив різних субстратів, зокрема зернового та дерев'яних паличок на життєздатність штамів при кріозберіганні. Отримані результати засвідчили вищу ефективність зернового субстрату порівняно з деревним щодо збереження життєздатності міцелію більшості досліджених штамів, а також суттєво доповнили сучасні уявлення про методи кріозберігання міцелію цінних видів грибів, зокрема *F. pinicola*, *G. sichuanense*, *L. officinalis*, *P. ostreatus* та *S. commune*.

Наступні чотири розділи присвячені дослідженню біотрансформації десяти речовин різної хімічної будови міцелієм обраних штамів видів базидієвих грибів, а отримані результати свідчать про перспективу використання міцелію досліджених базидієвих грибів у біотрансформації ксенобіотиків. В **шостому розділі** наведені експериментальні результати біотрансформації біциклічних амідів, що значно розширює розуміння метаболізму цих речовин міцелієм базидієвих грибів. **Сьомий розділ** присвячений біодеградації дихлоранілінів в умовах глибинного культивування та демонструє здатність міцелію всіх досліджених штамів дереворуйнівних базидієвих грибів перетворювати токсичні дихлораніліни. Важливим результатом, представленим у **восьмому розділі**, є встановлення ефективності міцелію дев'яти штамів базидієвих грибів у процесах біодеградації активних фармацевтичних інгредієнтів, зокрема напроксену та диклофенаку. У **дев'ятому розділі** здійснено комплексне дослідження біотрансформації культурами досліджених штамів дереворуйнівних базидієвих грибів адамантану на адамантол.

Десятий розділ підсумовує результати дослідження та містить цінні практичні рекомендації.

Загалом структура дисертації є послідовною та добре продуманою, а зміст окремих розділів логічно пов'язаний між собою і забезпечує повне розкриття поставлених мети та завдань дослідження.

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає в одержанні комплексу оригінальних результатів, що істотно розширюють сучасні уявлення про біотехнологічний потенціал базидієвих грибів. До найбільш вагомих нових результатів належить встановлення здатності міцелію дев'яти штамів п'яти видів базидієвих грибів до біотрансформації ксенобіотиків різної хімічної природи. Особливу наукову цінність мають результати, отримані для *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma sichuanense*, *Laricifomes officinalis* та *Schizophyllum commune*, оскільки для цих видів такі дослідження виконано вперше. Важливим є також обґрунтування перспективності використання міцелію досліджених грибів для одержання гідроксильованих метаболітів і біодеградації ксенобіотиків.

Автором уперше обґрунтовано доцільність використання зерна ячменю як субстрату для довготривалого низькотемпературного зберігання міцелію низки дереворуйнівних базидієвих грибів. Особливу цінність становлять перші відомості щодо кріозберігання штамів *Fomitopsis pinicola* і *Ganoderma sichuanense*, а також встановлення стимулювальної дії соняшникового лецитину на накопичення міцеліальної біомаси *Laricifomes officinalis*.

Практичне значення отриманих результатів є вагомим і полягає насамперед в тому, що отримані результати суттєво розширюють можливості біотехнологічного використання дереворуйнівних базидієвих грибів. Встановлена

здатність досліджених штамів до біотрансформації ксенобіотиків різної хімічної природи відкриває перспективи їх застосування для одержання цінних метаболітів і розроблення екологічно безпечних технологій біоремедіації забруднених середовищ. Важливе практичне значення мають результати молекулярної верифікації штамів із Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України та депонування отриманих нуклеотидних послідовностей до міжнародної бази даних GenBank, що підвищує наукову цінність колекційного матеріалу й забезпечує його доступність для подальших досліджень. Безперечний практичний інтерес становлять також удосконалений метод довготривалого зберігання міцелію, встановлення позитивного впливу соняшникового лецитину на накопичення біомаси *Laricifomes officinalis* та скорочення тривалості його глибинного культивування. Зазначені результати можуть бути використані для оптимізації біотехнологічних процесів культивування грибів, збереження цінних штамів і виробництва міцеліальної біомаси та біологічно активних сполук.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях. Результати дисертаційного дослідження пройшли належну апробацію та достатньою мірою висвітлені у наукових публікаціях автора. Основні положення роботи опубліковано у 3-х статтях у періодичних фахових виданнях України, 2 з яких у журналі, що індексується наукометричною базою даних SCOPUS, а також 4 тез доповідей у наукових збірниках конференцій.

Відсутність порушення академічної доброчесності. Аналіз дисертаційної роботи свідчить про її самостійний характер та належний рівень академічної культури автора. У роботі коректно використано літературні джерела, наведено необхідні посилання на попередні дослідження та власні публікації здобувача. Результати, винесені на захист, є авторськими та отримані особисто дисертантом або за його безпосередньої участі.

Порушень вимог академічної доброчесності, які могли б поставити під сумнів достовірність отриманих результатів чи самостійність їх одержання, не встановлено.

Дискусійні питання та зауваження до автора дисертаційної роботи в межах наукової дискусії:

Питання:

1. Чим обґрунтований вибір саме базидієвих грибів, асоційованих із хвойними породами дерев? Чи є експериментальні докази того, що їхня адаптація до деградації терпенів і фенольних сполук забезпечує вищу ефективність біотрансформації синтетичних ксенобіотиків порівняно з грибами, що розвиваються на листяних породах?

2. Чим був обґрунтований вибір соняшникового лецитину, а не соєвого, як додаткового компонента поживного середовища для *Laricifomes officinalis*? Чи розглядали Ви його виключно як джерело поживних речовин, чи припускали, що він може впливати на ферментативну активність і біотрансформаційний потенціал базидієвих грибів?
3. У роботі показано, що окремі штами по-різному реагували на використання зернового та дерев'яного субстратів при кріозберіганні. Чим, на Вашу думку, зумовлена така штамова специфічність і чи дозволяють отримані результати рекомендувати зерновий субстрат як універсальний для довготривалого зберігання міцелію дереворуйнівних базидієвих грибів?
4. Які ферменти базидієвих грибів, на вашу думку, відіграють ключову роль у трансформації диклофенаку?
5. Чи можна, на Вашу думку, розглядати досліджені штами як перспективні об'єкти для біологічного очищення стічних вод від фармацевтичних препаратів? Які основні проблеми та обмеження можуть виникнути при впровадженні таких технологій у промислових умовах?

Зауваження:

1. У розділі «Матеріали та методи» (формула 2.5.1.1) зазначено, що швидкість радіального росту (V_r) визначали в мм/добу (с. 52), тоді як у таблиці 5.2.2 цей показник наведено в см/добу (с. 101). Доцільно використовувати єдині одиниці вимірювання впродовж усієї роботи або надати пояснення щодо їх зміни, щоб уникнути неоднозначного трактування отриманих результатів.
2. У розділі «Матеріали та методи» на с. 53 у реченні «Оскільки швидкість росту штамів *Laricifomes officinalis* була низькою (Flores, Cusumano, et al., 2023), порівняно із попередніми штамами, для обраних штамів визначення концентрації біомаси та зміни рН культуральної рідини проводили кожну 5-ту добу культивування» не зрозуміло доречність посилання на роботу Flores et al., 2023. Адже автор особисто проводила відповідні дослідження з відповідними штамами *L. officinalis*.
3. У підсумках до третього розділу (с. 78) є певна неузгодженість. Так, автор зазначає, що «Загалом, результати проведених молекулярно-генетичних досліджень на основі згаданих вище ядерних локусів дозволили підтвердити видову ідентифікацію семи досліджуваних штамів із Колекції культур шапинкових грибів (ІВК), за винятком двох штамів ІВК 1848 та 2566, які було ідентифіковано як *G. sichuanense*». Проте в анотації та підсумовуючому розділі 10 написано наступне: «підтверджено видову приналежність восьми штамів базидієвих грибів,

а штамми IBK 1848 та 2566 переідентифіковано як *Ganoderma sichuanense*». Також автор зазначає, що нуклеотидні послідовності штамів із підтвердженою видовою належністю були внесені до бази даних GenBank. Доцільно було б продублювати номери цих послідовностей, оскільки саме вони є безпосереднім підтвердженням депонування та полегшують ідентифікацію відповідних записів у базі даних GenBank.

4. У розділі 4, присвяченому динаміці накопичення біомаси дереворуйнівних базидієвих грибів, автор визначає початок стаціонарної фази росту. Однак представлені на рис. 4.4, 4.4В та 4.4С експериментальні дані не дозволяють однозначно підтвердити цей висновок, оскільки спостереження завершуються на етапі зростання біомаси, а не виходу кривої на плато чи її подальшого зниження. Для обґрунтування переходу культури до стаціонарної фази доцільно було б продовжити культивування та показати стабілізацію накопичення біомаси або зменшення швидкості її приросту.
5. У третьому висновку наведено результати щодо впливу соняшникового лецитину на ріст *Laricifomes officinalis*, тоді як результати дослідження впливу рН поживного середовища, які також представлені в роботі, не знайшли відображення. Також в реченні «Визначивши закономірності динаміки накопичення міцеліальної біомаси обраних штамів в умовах глибинного культивування, встановлено оптимальний для внесення ксенобіотиків для дослідження процесу біотрансформації» пропущено слово «час».
6. До оформлення дисертації є незначне зауваження технічного характеру, зокрема рисунки та таблиці пронумеровано в межах підрозділів, тоді як відповідно до вимог їх слід нумерувати в межах розділів.

Втім, висловлені вище зауваження жодною мірою не знижують загального рівня роботи та не зменшують вагомості отриманих С.В. Бондарук результатів.

Загальний висновок. Дисертація Бондарук Світлани Володимирівни «Біотрансформація біологічно активних речовин чистими культурами базидієвих грибів», є завершеною самостійною науковою працею, у якій отримано нові науково обґрунтовані результати, що мають важливе значення для розвитку сучасної біології. Робота характеризується високим науковим рівнем, належною методологічною базою, значним обсягом фактичного матеріалу та практичною цінністю отриманих результатів.

На підставі викладеного можна зробити висновок, що розглянуте дисертаційне дослідження, подане на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» галузі знань 09 «Біологія», виконане на високому теоретичному і методологічному рівні та відповідає вимогам «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. № 261, Наказу Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40 (зі змінами) «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженому постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, а її автор, **Бондарук Світлана Володимирівна**, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

**Офіційний опонент,
кандидат біологічних наук, доцент,
доцент кафедри біології рослин
Навчально-наукового центру
«Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка**

Вероніка ДЖАГАН

