

ОТЗЫВ

официального оппонента,

доктора технических наук Дышлюк Любови Сергеевны
на диссертацию Прозоровой Илюзы Шамилевны «Разработка биотехнологии
культивирования *Daedaleopsis tricolor* для получения антиоксидантов»,
представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по
специальности 1.5.6. Биотехнология

Настоящая диссертация выполнена в области разработки научных основ биотехнологии получения биомассы базидиомицетов с целью выделения биоактивных эндо- и экзометаболитов, которые будут востребованы в технологии биологически активных добавок к пище.

Актуальность темы диссертационного исследования определяется поиском новых природных соединений, характеризующихся широким спектром фармакологической активности, для создания активных компонентов для пищевой и нутрицевтической промышленности.

Профилактическая медицина и пищевая промышленность проявляют повышенный интерес к поиску новых источников природных антиоксидантов, поскольку наиболее часто используемые синтетические антиоксиданты имеют ограниченное применение в пищевой промышленности. Неоднократно сообщалось, что широкий спектр базидиальных грибов синтезирует антиоксидантные соединения, к которым относятся, например, полисахариды, токоферолы, фенолы, каротиноиды, гликозиды, эргостерин, аскорбиновая кислота. Антиоксидантные компоненты грибов накапливаются в мицелии, плодовых телах и культуре. В настоящее время активно проводятся исследования по разработке методов культивирования грибов, продуцирующих антиоксидантные соединения, *in vitro*. Жидкофазное культивирование базидиомицетов представляет собой воспроизводимый и эффективный метод получения мицелия и метаболитов с целевой активностью.

В связи с вышеизложенным, разработка биотехнологии получения биомассы и экзометаболитов антиоксидантного действия гриба *Daedaleopsis tricolor* KS11 для

создания в дальнейшем биологически активных добавок на их основе является актуальным направлением научных и практических исследований.

Цель работы состоит в обосновании выбора продуцента антиоксидантов из введенных в культуру новых штаммов грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10 и разработке биотехнологии получения его биомассы и экзометаболитов для создания в дальнейшем биологически активных добавок на их основе.

Для достижения поставленной цели сформулированы задачи диссертационного исследования: (1) введение в культуру новых штаммов базидиальных грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10, сравнение их ростовых характеристик на плотных средах; (2) получение биокомпозита похожего на картон с использованием твердофазного культивирования *T. abietinum* KS10; (3) подбор питательных сред для погруженного жидкофазного культивирования *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10; (4) определение количества и антиоксидантных свойств эндометаболитов – пигментов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10, проведение их отнесения к меланинам; (5) определение количества и антиоксидантных свойств экзометаболитов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10, содержания в них простых фенолов; (6) обоснование выбора *D. tricolor* KS11 как перспективного продуцента биомассы, экзо-, эндометаболитов; (7) оптимизация состава питательной среды для погруженного жидкофазного культивирования *D. tricolor* KS11 с применением программы Statistica 13 для увеличения выхода биомассы и повышения антиоксидантных свойств экзометаболитов; (8) разработка блок-схемы, технологической схемы, расчёт материального баланса и технико-экономических показателей культивирования гриба *D. tricolor* KS11, формирование норм качества получаемых продуктов.

Диссертация является комплексным теоретическим и экспериментальным исследованием. Она изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 26 рисунков, 38 таблиц, 10 приложений. Список литературы включает 183 источника, в том числе 134 иностранных источника.

Структурно диссертация состоит из введения, семи глав, заключения, списка использованной литературы и десяти приложений.

Во введении обоснована актуальность темы, отражена степень разработанности темы исследования, сформулированы цель и задачи, необходимые для реализации поставленной цели, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Приведено краткое описание методов и методологии исследования; положения, выносимые на защиту.

В первой главе «Обзор литературы» представлен подробный анализ научно-технической литературы о тенденциях развития технологий применения биологически активных веществ, выделенных из базидиомицетов, в пищевой и фармацевтической промышленности. Описаны лекарственные и биологически активные вещества грибов – полисахариды, белки, ферменты, липофильные соединения, фенольные соединения, пигменты. Рассмотрен биотехнологический потенциал грибов рода *Daedaleopsis*, *Pycnoporellus* и *Trichaptum*. Освещены инновации в области создания биопродуктов для пищевой, фармацевтической и косметической промышленности на основе культивируемых базидиомицетов. На основании приведенных литературных данных определена актуальность собственных исследований.

Во второй главе «Экспериментальная часть» представлено описание материалов, используемых в работе, и методов исследования: выделения чистых культур грибов, культивирования *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12, *T. abietinum* KS10 на плотных питательных средах, твёрдофазного культивирования *T. abietinum* KS10, погружённого культивирования грибов, получения экстрактов экзометаболитов грибов, секвенирования по методу Сэнгера, микроскопирования, определения радиальной скорости при культивировании на плотных питательных средах, определения количества биомассы, выделения эндопигментов, определения содержания общих фенольных соединений и флавоноидов, оценки антиоксидантной активности, высокоэффективной тонкослойной хроматографии, ИК-спектроскопии, определения микробиологической чистоты.

В третьей главе «Введение в культуру новых штаммов грибов и их культивирование на плотных и твёрдых средах» автором предложена схема выделения чистых культур базидиальных грибов *D. tricolor*, *P. fulgens* и *T. abietinum*, для которых изучена макро- и микроморфология. Таксономическая принадлежность выделенных культур подтверждена секвенированием по методу Сэнгера. Культуры

депонированы в базу данных GenBank Overview. Соискателем подобраны условия культивирования, в том числе состав питательных сред, на плотных средах базидиомицетов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 и определены ростовые характеристики штаммов. Продемонстрирована возможность создания композиционных биоматериалов на основе мицелия *T. abietinum* KS10, выращенного на лузге семян подсолнечника.

В четвертой главе «Погруженное жидкофазное культивирование *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10» автором подобраны составы сред для глубинного жидкофазного выращивания *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10. По результатам экспериментальных исследований им показана перспективность использования гриба *D. tricolor* KS11 для разработки биотехнологий по получению биомассы и экзометаболитов. Также в четвертой главе соискателем оценены физико-химические свойства (содержание фенолов, антиоксидантная активность, антирадикальная активность) экзометаболитов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 при погруженном культивировании на разных питательных средах. Кроме того, исследованы физико-химические свойства эндопигментов (концентрация эндопигментов, антиоксидантная активность) *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10. С использованием метода ИК-спектроскопии соискателем установлена принадлежность эндопигмента, выделенного из биомассы *D. tricolor* KS11, к меланинам.

В пятой главе «Оптимизация состава питательной среды с помощью метода планирования эксперимента для погруженного культивирования *D. tricolor* KS11» с использованием планирования эксперимента автором оптимизирован состав среды для культивирования *D. tricolor*, обеспечивающего максимальное накопление метаболитов антиоксидантного действия. Проведен эксперимент по масштабированию процесса культивирования гриба *D. tricolor* в колбах большого объема.

Шестая глава «Разработка биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11» посвящена составлению и описанию блок-схемы погруженного культивирования *D. tricolor* KS11, разработке аппаратурно-технологической схемы биотехнологии культивирования *D. tricolor* KS11 для получения антиоксидантов, подбору основного и вспомогательного оборудования, а также расчету материального баланса получения продуктов (биомассы и экзометаболитов гриба *D. tricolor* KS11) и

разработке норм качества на продукты, получаемые при культивировании базидиомицета *D. tricolor* KS11.

В седьмой главе «Технико-экономическое обоснование биотехнологии культивирования *D. tricolor* KS11» соискателем предложен график работы планируемого производства, представлены капитальные затраты и амортизационные отчисления на оборудование, приведен расчет стоимости сырья и основных материалов, расчет количества и стоимости энергоресурсов, расчет затрат на оплату труда персонала, расчет сметы себестоимости готовой продукции. Автором рассчитана себестоимость единиц готовой продукции пищевых добавок и БАД на основе экзометаболитов и биомассы *D. tricolor* KS11.

В заключении автор подводит краткие итоги по результатам проделанной работы.

Далее приведены список использованной литературы и приложения к диссертации по практическому использованию ее результатов.

Достоверность результатов, представленных в работе, не вызывает сомнений. Научные положения, выводы и рекомендации, представленные в диссертации, теоретически обоснованы и подтверждены результатами экспериментов. Экспериментальные исследования, проведенные с применением современных методов (секвенирование по методу Сэнгера, микроскопирование, спектрофотометрия, высокоэффективная тонкослойная хроматография, ИК-спектроскопия) и средств измерения, подтверждают все высказанные в теоретическом исследовании утверждения. Экспериментальные результаты обработаны с использованием математических методов. Для статистической обработки результатов экспериментов применяли Statistica 13. Повторность проведения экспериментов не менее чем трехкратная.

Следует отметить убедительную апробацию результатов, вынесенных на защиту диссертантом, на конференциях и форумах различного уровня в Российской Федерации.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 8 работ, из них 1 статья в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК Минобрнауки России, 2 статьи в научных изданиях, индексируемых в МБД Scopus и WoS, и 5 публикаций в сборниках Международных и Всероссийских научных конференций.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, очевидна и определяется следующим:

введены в культуру и депонированы в базу данных GenBank новые штаммы грибов *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10;

впервые показано, что *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 можно отнести к быстро растущим, поскольку они способны накопить биомассы до 125 мг и 205 мг за 9 и 6 суток соответственно, при выращивании на плотной среде, содержащей глюкозу и дрожжевой экстракт, при температуре 27°C, что в 1,8 и 2,9 раз больше и на 7 и 10 дней быстрее, по сравнению с *P. fulgens* KS12;

выявлена перспектива твердофазного культивирования *T. abietinum* KS10 на лузге подсолнечника с добавкой 1 % овсяных отрубей с получением биокомпозитов для изготовления упаковочных материалов;

описаны особенности роста, морфология мицелия, а также формирование колоний и пеллет *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10 при их погруженном культивировании и на плотных средах;

при погруженном культивировании *D. tricolor* KS11 на 4 сутки на среде с дрожжевым экстрактом и соевым изолятом (1:1) культура накапливает биомассу на 14 % и 26 % больше, по сравнению с *T. abietinum* KS10 на 3 сутки на питательной среде с дрожжевым экстрактом, и *P. fulgens* KS12 на 15 сутки на среде с соевым изолятом;

экзометаболиты *D. tricolor* KS11, по сравнению с экзометаболитами *T. abietinum* KS10 содержат в 2,9 раза больше простых фенолов, и их антирадикальная активность (IC50, ДФПГ) в 2,4 раза выше;

эндопигменты *D. tricolor* KS11 обладают антирадикальной активностью (IC50, ДФПГ), превышающей в 3,5 раза аналогичную активность эндопигментов, выделенных из пищевых добавок, содержащих мицелий грибов, Cordyceps (ООО «Компания Хорст») и *Trametes versicolor* (NS Organic);

экспериментально доказан выбор *D. tricolor* KS11 для разработки биотехнологии получения биомассы и экзометаболитов с целью создания на их основе пищевых и биологически активных добавок антиоксидантного действия.

Теоретическая и практическая значимость диссертационного исследования:

– обобщены данные, приведенные в научной литературе, по культивированию, получению биомассы и метаболитов, а также по составу биологически активных веществ, накапливаемых *Daedaleopsis tricolor*, *Russporellus fulgens* и *Trichaptum abietinum*, и разработке биопродуктов на основе бизидиомицетов;

– проведенная оптимизация состава среды для погруженного культивирования *D. tricolor* KS11 позволяет получить экзометаболиты с антирадикальными свойствами в 10 раз более высокими по сравнению с исходными;

– при масштабировании процесса погруженного культивирования *D. tricolor* KS11 на средах разного состава в колбах объёмом на 0,75 л, 1 л и 2 л получены одинаковые результаты по количеству биомассы;

– разработана биотехнология культивирования гриба *D. tricolor* KS11 с годовой производительностью 434,7 кг биомассы и 170,1 кг экзометаболитов;

– сформированы нормы качества на биомассу и экзометаболиты *D. tricolor* KS11;

– биомасса *D. tricolor* KS11 может быть использована для создания пищевых и биологически активных добавок, поскольку она безопасна ($LD_{50} > 8000$ мг/кг) и отнесена к 4-му классу токсичности;

– разработан способ получения биокомпозита, который может быть применен для создания упаковочных материалов, путем проведения твердофазного культивирования *T. abietinum* KS10;

– основные результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО КНИТУ при подготовке магистров, обучающихся по направлению 19.04.01 «Биотехнология»;

– разработаны технические условия на добавки биологически активные к пище на основе биомассы и экзометаболитов гриба *Daedaleopsis tricolor* KS11.

Высоко оценивая результаты проведенных Прозоровой И.Ш. исследований, целесообразно сделать некоторые **замечания и пожелания**, которые не носят принципиального характера:

1) В разделе 2.8.20 (стр. 47 диссертации) требуется уточнение: какие статистические критерии и гипотезы использовали для обработки экспериментальных данных, каков уровень значимости.

2) В разделе 3.3 (рисунок 3.8) не ясно, почему культивирование гриба *T. abietinum* KS10 при использовании неизмельченной лузги подсолнечника и измельченной лузги с добавлением 1% овсяных отрубей осуществляется на протяжении 7 суток, а при использовании измельченной лузги – в течение 10 суток, хотя во всех трёх случаях прекращение роста диаметров колоний не очевидно.

3) В разделе 3.3 (стр. 62) целесообразно было представить результаты более детальных исследований композиционных материалов, полученных при культивировании *T. abietinum* на лузге семян подсолнечника.

4) В разделе 4.2 (рисунок 4.3) продолжительность культивирования выражена в «г/л». Видимо, это техническая ошибка?

5) В разделе 4.4 (стр. 74) описана процедура оценки содержания экзометаболитов гриба *P. fulgens* KS12 в экстрактах, полученных с использованием различных органических растворителей, визуально по окраске. Требуется пояснение, почему для оценки интенсивности окраски не применялся инструментальный метод (спектрофотометрия).

6) В разделе 4.4 (стр. 76) не ясно, почему метод ВЭТСХ использовался только для качественного анализа фенольных и липофильных соединений; требуется пояснение, почему не проводился количественный анализ и сопоставление полученных результатов с литературными данными.

7) В разделе 4.4 (стр. 76) требуется пояснить тезис о более широком спектре стероидных веществ в экстракте с дополнительным пятном с $R_f=0,09$.

8) В разделе 4.4 (стр. 78) целесообразно дать пояснение, с какими предполагаемыми особенностями метаболизма связана более высокая доступность соевого изолята для *T. abietinum* KS10.

9) В главе 5 (таблица 5.1) требуется пояснение, почему для оценки антиоксидантной активности эндопигментов используются фосфомолибденовый и фенантролиновый методы, в то время как оценка антиоксидантной активности экзометаболитов выполняется с использованием фосфомолибденового, фенантролинового методов и метода ДФПГ.

10) В главе 5 (стр. 83) не очевидно утверждение о том, что увеличение переменной x_1 , имеющей отрицательное значение, приведет к возрастанию антиоксидантных свойств экзометаболитов; требуется пояснение.

11) В разделе 6.1 (стр. 90) при описании сушки экзометаболитов не указан способ сушки и значения параметров высушивания; требуется пояснение.

12) В тексте диссертации имеются технические ошибки и неточности: «Глава 5. Оптимизация состава питательной среды с помощью метода планирования....» (стр. 81); в таблице 5.2 для значений в трёх последних строках (выходные параметры) не указаны значения доверительных интервалов (стр. 82); «....на действующем биотехнологическом предприятии, имеющем все коммуникации» (стр. 103); «Рассчитана их стоимость» (стр. 109); «Стоимость курса на 1 месяц пищевых добавок и БАД, имеющихся на рынке и разработанных продуктов на основе биомассы и экзометаболитов *D. tricolor* KS11».

Очевидно, что высказанные замечания носят дискуссионный характер и не касаются существа диссертационной работы, ее основных концепций, полученных экспериментальных результатов, выводов и рекомендаций и не влияют на общую положительную оценку обсуждаемой работы.

Основные этапы работы, выводы и результаты представлены в автореферате. Содержание автореферата соответствует основному содержанию диссертации. Работа носит законченный характер, написана логичным, ясным языком, стиль изложения доказательный.

Диссертационная работа Прозоровой Илюзы Шамилевны представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, в которой на основании выполненных автором исследований фундаментального и прикладного характера изложены новые научно обоснованные технические и технологические решения и разработки для получения биомассы и экзометаболитов, таких как фенольные соединения, меланины, β -глюканы, гриба *Daedaleopsis tricolor*, на основе которых могут быть созданы эффективные биологически активные добавки к пище и лекарственные препараты, обладающие антиоксидантной, иммуномодулирующей, противовирусной, антиканцерогенной активностью, способные решить проблему импортозамещения в РФ.

