

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора технических наук Минакова Дениса Викторовича на диссертационную работу 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.

Актуальность работы

Перспективы культивирования высших грибов и получение из них биологически активных веществ обусловлены высокой их востребованностью в пищевой, фармацевтической и косметической отраслях. Растущий рынок функционального питания и биологически активных добавок стимулирует развитие современных биотехнологий для культивирования штаммов с высокой продуктивностью и содержанием активных метаболитов. Современные технологии позволяют создавать эффективные условия выращивания, в том числе на малых автоматизированных фермах, обеспечивая стабильное качество и высокий выход биомассы и экстрактов.

Особое внимание уделяется грибам, обладающим выраженной антиоксидантной, противомикробной и противовоспалительной активностью, что расширяет их применение в профилактике и лечении хронических заболеваний. Перспективным также является использование доступных субстратов и разработка биопродуктов с оптимальными функциональными свойствами, способствующих увеличению эффективности и доступности продукции на рынке.

В последние годы возрос интерес к культивированию базидиомицетов, в частности *Daedaleopsis tricolor*, *Pycnoporellus fulgens* и *Trichaptum abietinum*, для получения биомассы и метаболитов с высокой антиоксидантной активностью. Современные биотехнологические подходы направлены на разработку эффективных технологий культивирования штаммов с оптимизацией состава питательных сред и условиями выращивания. Это обеспечивает возможность создания на основе грибов новых биологически активных добавок и фармацевтических продуктов, которые могут использоваться для профилактики и лечения различных заболеваний. В связи с этим поиск новых, конкурентоспособных штаммов, способных расти на доступных средах и синтезировать высокоактивные метаболиты, является значимой и перспективной задачей современной науки и промышленности.

Анализ содержания диссертационной работы

Диссертационная работа Прозоровой И.Ш. изложена на 147 страницах и включает 38 таблиц, 26 рисунков и 10 приложений. При написании работы было использовано 183 литературных источника, из которых 134 на иностранном языке. Структура диссертационной работы отличается логичностью и позволяет обосновать целесообразность проводимых исследований.

Во введении изложена актуальность работы, поставлена цель, определены задачи, сформулированы научная новизна, обоснована теоретическая и практическая значимость работы, методология исследований, приведены научные положения, выносимые на защиту. Указан личный вклад автора в проведенные исследования, представлены сведения о достоверности и апробации результатов диссертационного исследования.

В первой главе обобщены литературные сведения о метаболитах высших грибов и их биологически активных свойствах. Детально проанализирован потенциал базидиомицетов *Daedaleopsis tricolor*, *Pycnoporellus fulgens* и *Trichaptum abietinum*, включая особенности их культивирования на плотных и жидких питательных средах. Представлены актуальные направления разработки биотехнологических продуктов на основе биомассы мицелия высших грибов с возможным применением в различных отраслях промышленности, в частности, в области медицины.

Во второй главе подробно изложены материалы и методы, применённые в ходе исследования. Особое внимание уделено процессам выделения и идентификации чистых культур грибов. Описаны условия культивирования культур на различных типах питательных сред, а также проведён анализ их культурально-морфологических и ростовых характеристик с целью оценки жизнеспособности и продуктивности. Представлены способы выделения экзо- и эндометаболитов. Для оценки содержания фенольных соединений применён классический метод Фолина-Чокальтеу, дополненный определением простых фенолов и флавоноидов, что позволяет всесторонне охарактеризовать антиоксидантный потенциал метаболитов грибов. Исследование антиоксидантной активности проводилось с использованием фосфомолибденового и фенантролинового методов, а также оценки антирадикальных свойств методом с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. Для дополнительного анализа химического состава применялась инфракрасная спектроскопия. Приведены составы используемых питательных сред, а также систем растворителей и проявителей, задействованных при хроматографическом анализе фенольных и липофильных соединений методом высокоэффективной тонкослойной

хроматографии, что гарантирует высокую точность и воспроизводимость получаемых результатов. Немаловажным аспектом является описание этапов планирования эксперимента и подробная статистическая обработка данных с помощью программы Statistica 13, что подтверждает научную обоснованность и достоверность результатов исследования.

Третья глава диссертации посвящена получению новых штаммов грибов *D. tricolor* KS11, *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10, выделенных из природных плодовых тел, собранных в смешанных лесах Республики Татарстан и Республики Марий Эл в 2019 и 2022 годах. Идентификация штаммов проведена с использованием культуральных и морфологических характеристик, а также методом секвенирования по Сэнгеру, что подтверждено высоким сходством последовательностей (более 99%) с данными в базе GenBank. Культивирование новых культур на плотных средах изучено с подбором оптимальных источников углерода и азота, а также температурных условий (оптимальная температура – 27 °C), что продемонстрировало их эффективный рост и накопление биомассы в зависимости от состава среды, в частности, среда с дрожжевым экстрактом и энтегнином. Подробно описан процесс твердофазного культивирования штамма *T. abietinum* KS10 на лузге подсолнечника разных фракций с добавлением овсяных отрубей, что позволило получить биокомпозит с характеристиками, напоминающими картон. Это указывает на возможность создания композитных биоматериалов на основе мицелия данного гриба. В целом, полученные результаты отражают всесторонний подход к выделению, идентификации и оптимизации условий выращивания перспективных штаммов базидиомицетов с практическим применением.

В четвертой главе подробно рассмотрены оптимальные источники азотсодержащего субстрата для глубинного культивирования исследуемых базидиомицетов, направленный на достижение максимального роста и накопления биомассы. В работе показано, что внесение в среду соевого изолята существенно влияет на скорость и продуктивность культивирования: для *D. tricolor* KS11 комбинированная среда с дрожжевым экстрактом и соевым изолятом обеспечила значительное сокращение продолжительности культивирования биомассы. Культура грибов *P. fulgens* KS12 предпочитает среду с дрожжевым экстрактом и энтегнином, но на среде с соевым изолятом достигается двукратное увеличение биомассы к 15 суткам. Для *T. abietinum* KS10 использование соевого изолята с высоким содержанием белка замедляет рост, тогда как текстураты с меньшим содержанием белка позволяют быстрее достигать максимума биомассы.

Исследование экзометаболитов выявило значительные различия в их антиоксидантных и антирадикальных свойствах в зависимости от состава

среды и вида гриба. Максимальные показатели активности и содержания простых фенолов были зарегистрированы у *D. tricolor* KS11 на комбинированной среде, где количество фенолов возросло в 8,6 раза. Аналогично, у *T. abietinum* KS10 экзометаболиты, полученные на среде с соевым изолятом, обладали более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с дрожжевым экстрактом. Для *P. fulgens* KS12 наблюдалась более высокая антиоксидантная активность на среде с дрожжевым экстрактом, тогда как антирадикальные свойства были выше при культивировании на среде с соевым изолятом. Анализ фенольных и липофильных соединений экстрактов методом ВЭТСХ подтвердил наличие различий в составе экзометаболитов в зависимости от среды, что подчёркивает значимость выбора питательного субстрата для целевого получения биологически активных соединений.

В разделе представлено исследование эндометаболитов – меланиновых пигментов, обладающих высокой антиоксидантной активностью. Установлено, что синтез эндопигментов *D. tricolor* KS11 и *P. fulgens* KS12 на среде с соевым изолятом происходит в большем количестве, но с меньшей биологической активностью. Напротив, на средах с дрожжевым экстрактом и комбинированной средой количество пигментов снижается, однако их антиоксидантные свойства повышаются. В целом, *D. tricolor* KS11 и *T. abietinum* KS10 демонстрируют синтез похожих по количеству и активности эндопигментов за более короткий период по сравнению с *P. fulgens* KS12, что свидетельствует о перспективности их биомассы для дальнейших исследований и практического применения.

В пятой главе обоснован выбор культуры *D. tricolor* KS11 как перспективного продуцента биомассы, экзо- и эндометаболитов. На основании экспериментальных данных установлено, что при культивировании на комбинированной среде данный штамм накапливает максимальное количество биомассы – 8,67 г/л, при этом его экзометаболиты содержат наибольшее количество простых фенолов и обладают высокими антирадикальными свойствами по показателю $IC_{50}=3,41$ мг/мл по сравнению с *P. fulgens* KS12 и *T. abietinum* KS10. Для оптимизации состава питательной среды при погруженном культивировании применён метод планирования эксперимента с использованием программы Statistica 13, что позволило определить оптимальные концентрации компонентов: соевого изолята – 3 г/л, дрожжевого экстракта – 2,5 г/л и глюкозы – 10 г/л. Культивирование на оптимальной среде подтвердило высокую антирадикальную активность экзометаболитов и значительное накопление биомассы (6,81 г/л), что служит основой для дальнейшей биотехнологической разработки. В главе представлены результаты сравнения антирадикальных свойств эндопигментов *D. tricolor* KS11 с аналогичными пигментами из биологически активных добавок на

основе мицелия *Cordyceps*. Показано, что эндопигменты *D. tricolor* KS11 превосходят аналоги по антиоксидантной активности в 3,5 раза и требуют в 1,5 раза меньшего количества для достижения эффективного результата. Это подчёркивает перспективность использования биомассы и экзометаболитов *D. tricolor* KS11 при создании конкурентоспособных биопродуктов. Масштабирование процесса глубинного культивирования в лабораторных условиях подтвердило стабильный рост и синтез биомассы на разных объёмах, без изменений в морфологии мицелия и свойствах культуральной жидкости, что важно для будущего промышленного производства.

В шестой главе представлена детальная разработка биотехнологии глубинного культивирования *D. tricolor* KS11 с расчетом материального баланса и созданием блок-схемы технологического процесса. Согласно расчётам, при работе ферментера объёмом 1500 л за один производственный цикл возможно получить 6,9 кг биомассы и 2,7 кг экзометаболитов. Аппаратурно-технологическая схема, представленная на рисунке 9, включает полный перечень используемого оборудования – от лабораторных колб и ферментеров до систем сепарации, ультрафильтрации, сушки и фасовки. Даны характеристики продуктов, получаемых по разработанной технологии, и установлены нормы качества. Проведены токсикологические исследования биомассы *D. tricolor* KS11 на белых мышах линии ICR, подтвердившие её безопасность ($LD_{50} > 8000$ мг/кг), что по классификации Хабриева относит её к малотоксичным веществам 4-го класса. Биомасса и экзометаболиты соответствуют микробиологическим стандартам ТР ТС 021/2011 и могут использоваться для создания пищевых и биологически активных добавок. Предлагаемая технология рассчитана на внедрение на малых пищевых предприятиях с возможностью расширения ассортимента продукции за счёт использования различных продуцентов биологически активных веществ.

В седьмой главе представлено всестороннее технико-экономическое обоснование разработанной биотехнологии культивирования гриба *D. tricolor* KS11. Расчёты показывают возможность проведения до 63 производственных циклов в год, что обеспечит годовую продуктивность в 434,7 кг биомассы и 170,1 кг экзометаболитов. Полученные продукты могут применяться как в виде индивидуальных пищевых добавок, так и в составе многокомпонентных биологически активных комплексов, а также в косметической индустрии.

В заключении приведены выводы, согласованные с задачами диссертационного исследования.

Приложения содержат графические объекты, документы, подтверждающие научную новизну проведенных исследований, результаты апробации предложенных технологических решений при внедрении результатов работы.

Проведенный анализ материалов диссертации, автореферата, публикаций автора позволяет сделать вывод, что в целом их содержание раскрывает цель и поставленные в исследовании задачи.

Соответствие автореферата содержанию диссертации

Структура и содержание диссертации соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата технических наук. Содержание автореферата и публикаций достаточно полно отражает содержание диссертационной работы.

Степень обоснованности и достоверности основных научных положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, научно обоснованы и базируются на подробном теоретическом анализе, а их достоверность подтверждена массивом данных, полученных существенным объемом аналитических и экспериментальных исследований, в комплексе с корректной математической и статистической обработкой.

Личный вклад соискателя не вызывает сомнений и заключается в анализе научно-технической информации по теме исследования, определении цели исследования, постановке и решении задач, выполнении теоретических и экспериментальных исследований, анализе, обобщении, обработке и внедрении результатов.

Научные положения и результаты диссертационной работы полноценно отражены в публикациях автора на международных научных и научно-практических конференциях.

Публикации результатов исследований

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, из них 1 статья в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК Минобрнауки России, 2 статьи в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science, 5 публикаций в сборниках международных и всероссийских научных конференциях.

Научная новизна полученных результатов, положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

1. Получены чистые культуры высших грибов и депонированы в базу данных GenBank новые штаммы *Daedaleopsis tricolor* KS11, *Pycnoporellus fulgens* KS12 и *Trichaptum abietinum* KS10.

2. Обоснована перспектива твёрдофазного культивирования *T. abietinum* KS10 на лузге подсолнечника с 1% добавкой овсяных отрубей для получения биокomпозитов, применимых в изготовлении упаковочных материалов.

3. Подробно описаны особенности роста, морфология мицелия и формирование колоний и пеллет трёх штаммов при глубинном культивировании и на плотных средах.

4. Установлено, что экзометаболиты *D. tricolor* KS11 содержат в 2,9 раза больше простых фенолов и обладают в 2,4 раза более высокой антирадикальной активностью по сравнению с экзометаболитами *T. abietinum* KS10.

5. Установлено, что эндопигменты *D. tricolor* KS11 демонстрируют антирадикальную активность, превышающую в 3,5 раза аналоги из пищевых добавок с мицелием грибов *Cordyceps* и *Trametes versicolor*.

6. Экспериментально подтверждён выбор *D. tricolor* KS11 для разработки биотехнологии получения биомассы и экзометаболитов с целью создания антиоксидантных пищевых и биологически активных добавок.

Теоретическая и практическая значимость

1. Обобщены литературные данные по культивированию биомассы и метаболитам грибов *Daedaleopsis tricolor*, *Pycnoporellus fulgens* и *Trichaptum abietinum*, а также разработке биотехнологических продуктов на их основе.

2. Оптимизация состава среды для погруженного культивирования *D. tricolor* KS11 позволила повысить антирадикальные свойства экзометаболитов в 10 раз по сравнению с исходными.

3. Масштабирование процесса глубинного культивирования *D. tricolor* KS11 в колбах объёмом 0,75, 1 и 2 л показало стабильность накопления биомассы.

4. Разработана биотехнология культивирования *D. tricolor* KS11 с годовой производительностью 434,7 кг биомассы и 170,1 кг экзометаболитов; сформированы нормы качества на продукцию.

5. Биомасса *D. tricolor* KS11 признана безопасной (ЛД₅₀ > 8000 мг/кг) и может применяться для создания пищевых и биологически активных добавок.

6. Разработан способ получения биокomпозита из *T. abietinum* KS10 методом твердофазного культивирования для использования в упаковочных материалах.

7. Основные результаты внедрены в учебный процесс кафедры пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО КНИТУ для подготовки магистров направления 19.04.01 «Биотехнология».

8. Разработаны технические условия на биологически активные пищевые добавки на основе биомассы и экзометаболитов *Daedaleopsis tricolor* KS11.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

1. В главе 1 автору следовало бы более широко рассмотреть методы выделения биологически активных веществ из биомассы высших грибов. В п. 1.3 «Биопродукты на основе культивируемых базидиомицетов» желательно бы составить таблицу с получаемыми продуктами на основе высших грибов.

2. В главе 2, стр. 34-36 представлены различные составы питательных сред для культивирования мицелия грибов. Однако в представленном списке нет среды «сусло-агар», являющейся классической и наиболее распространенной средой для выделения чистых культур мицелия высших грибов и их культивирования. Чем это объясняется?

3. Чем обусловлен выбор лигноцеллюлозных субстратов при твердофазном культивировании грибов (стр. 60)? Автор в диссертации и автореферате употребляет словосочетания «шелуха семян подсолнечника» и «лузга подсолнечника», следовало бы употреблять одно словосочетание и использовать его последовательно в тексте для повышения точности и единообразия научного стиля.

4. При глубинном культивировании биомассы проводились ли исследования по установлению фаз роста мицелия (стр. 63-70)? В какой фазе роста образуется максимальное количество метаболитов?

5. При разработке требований, предъявляемых к биомассе и экзометаболитам *D. tricolor* KS11, какое из представленных в таблице 6.15 веществ можно отнести к действующему (стр. 100-101)?

Представленные вопросы и замечания носят рекомендательный и дискуссионный характер, не являются принципиальными и не умаляют достоинств и соответствия представленной к защите диссертационной работы, поскольку полученные результаты обладают новизной, высокой научной и практической значимостью. Это позволяет заключить, что диссертационная работа Прозоровой И.Ш. является завершенной научно-квалификационной работой и оригинальным исследованием, выполнена на высоком методическом уровне, в ней получены новые фундаментальные знания, научно обоснованные технические и технологические решения, которые вносят вклад в развитие биотехнологии в РФ.

Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о порядке присуждения учёных степеней

В целом диссертационная работа Прозоровой И.Ш. является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором на

Таким образом, по структуре, объему проведенных исследований, их аналитической проработке и уровню практической значимости, диссертационная работа соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения и присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым ВАК Минобрнауки России к кандидатским диссертациям, а её автор Прозорова Илюза Шамилевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата технических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Минаков Денис Викторович

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологических активных веществ.

Адрес места работы: 656049, Алтайский край, город Барнаул, проспект
Ленина, дом 61.

Allen

11.11.2025

ПОДПИСЬ

дата



Вход. № 05-8612
« 19 » 11 2025 г.
подпись Браер