

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Жилинской Наталии Викторовны «Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr) Bond. et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.:Fr.) P. Karst и *Trametes versicolor* (L.:Fr) Lloyd: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

Актуальность исследования

В последнее десятилетие, во многом, в связи с успехами в методах выращивания чистых культур макромицетов, высшие базидиомицеты часто используются исследователями в разных направлениях биотехнологии. Такие представители как *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Lentinus*, *Inonotus* способны синтезировать уникальные биологически активные вещества с антимикробной, противовирусной, антифунгальной, противоопухолевой, иммуномодулирующей, антиаллергической, гиполипидемической, гепатопротекторной, противодиабетической, противотромбозной, гипотензивной, антигельминтной, антиоксидантной, протеолитической и другими активностями [Wasser Veis 1999, Краснопольская Л.М. 2006, Агафонова С.В. и др. 2008, Громовых Т.И. 2008, Псурцева Н.В. и др. 2012]. Известны более 3000 соединений, выделенных от базидиомицетов [Тихонова О.В., Катруха Г.С. 2008]. Антибиотические вещества чаще всего относятся к непредельным и ароматическим соединениям с преобладанием антибиотиков терпеноидной структуры. Очень важно, что эти вещества эффективны в отношении лекарственно-устойчивых бактериальных патогенов. Однако ксилотрофные базидиомицеты родов *Fomitopsis* и *Trametes* с антагонистическим действием против патогенных и условно-патогенных бактерий, контаминирующих пищевые продукты, до исследований Жилинской Н.В. так многопланово не изучались. О них имеются немногочисленные сведения по трофическим потребностям, условиям культивирования (например, глубинное выращивание листовничной губки *Fomitopsis officinalis* и *F. pinicola* на специально составленных средах [Ильина Г.В. и др. 2008] с добавлением стимулятора роста – гуминовых кислот [Сидоренко М.Л. и др. 2008]), а также о *Trametes versicolor*, известном как каваратаке – лекарственный гриб японской народной медицины и продуцент противоопухолевого препарата Крестина, фермента лакказы, стеролов, неидентифицированных антибактериальных веществ. Для другого вида *Trametes hirsuta* 56 МГУ инженерной экологии и Институтом биохимии им. А.Н. Баха разработана промышленная технология получения фермента лакказы [Горшина Е.С. 2008]. Препарат может быть использован для получения нанопокрытий при защите некоторых соединений от электромагнитного излучения, коррозии и др., а также как биосвязующий компонент в

биопластиках на основе древесно-волоконистых материалов. Этими же авторами разработана биологически активная добавка на основе сухой биомассы еще одного вида *Trametes pubescens*, которая после медико-биологических и клинических исследований охарактеризована как безопасная, имеющая онкостатическое, гепатопротекторное, иммуномодулирующее действие. Препарат выпускается под названием «Трамелан» в виде таблеток.

Эти литературные данные свидетельствуют об актуальности темы диссертации и практическом потенциале других штаммов *Fomitopsis* и *Trametes*, с которыми работала диссертант.

Сформулированная Жилинской Н.В. цель исследования, на наш взгляд, излишне краткая и уменьшает масштабность вопросов, которые поставлены автором в задачах работы и затем успешно решены экспериментально. Так, у взятых из музея культур базидиомицетов *Fomitopsis* и *Trametes*, помимо определения ключевого свойства – антагонистической активности, изучены морфологические, физиологические, молекулярно-генетические, токсические. На основании совокупности признаков проведена идентификация грибов до вида. Такие сведения необходимы, чтобы диссертант могла оценить область применения этих культур в пищевой промышленности.

Более подробно проанализирую методический раздел, который считаю основой качества осуществления поставленных задач. Жилинская Н.В. исполнила работу с использованием комплекса современных методов, которые указывают на многопрофильный профессиональный уровень подготовки диссертанта как биотехнолога (микроморфологическое изучение посредством сканирующей электронной микроскопии, люминесцентная микроскопия, твердо- или жидкофазное культивирование штаммов, определение антагонистической и ферментолитической активности, установление физиологических особенностей грибных культур, исследование ядерной р-ДНК с транскрибируемым спейсерным участком ITS, хроматография, изучение на специальных приборах действия на штаммы акустических волн, когерентного и некогерентного света). Автором использованы также классические методики определения биохимического состава мицелия и новые подходы, например, определение степени перевариваемости белка на уникальном отечественном аппарате «искусственный желудок». Токсичность штаммов тестировалась на 2 видах инфузорий. Практически важными биотехнологическими приемами были: изготовление экспериментального образца колбасной продукции с сухой мицелиальной пленкой и с последующим определением ее показателей; конструирование полимерных покрытий на основе метилцеллюлозы с биологически активным мицелием или культуральным фильтратом.

Статистическая обработка данных, а также их контроль при грантовой поддержке работы позволяют считать результаты высоко достоверными.

Анализ этих данных проведен нами по принципу обоснования сделанных выводов. Так, первый вывод основан на ключевых экспериментальных фактах о содержании в биомассе мицелия 18 штаммов *Fomitopsis* и *Trametes* антибактериальных веществ, которые диссертант экстрагировала этанолом и водой. Максимальная антибактериальная активность была характерна для спиртовых экстрактов. Особенностью противобактериального действия изученных базидиомицетов являлась активность препаратов холодной экстракции и культуральных фильтратов в отношении *E. coli*. Кроме того эти экстракты из штаммов *Fomitopsis* действовали в отношении *B. coagulans* и *C. albicans*, а из штаммов *Trametes* ингибировали рост *S. aureus*. Оказалось, что культура *C. albicans* была избирательно чувствительна к препаратам *Fomitopsis*, полученным горячей и исчерпывающей фильтрацией. Испытанные тест-культуры показали разный уровень чувствительности к экзометаболитам культуральной жидкости грибов. Те же экстракты из 18 штаммов базидиомицетов автор проверила в отношении культур *Penicillium* – основного плесневого гриба, контаминирующего пищевую продукцию. Сравнение противоплесневой (антибиотической, миколитической) активности позволило установить наиболее эффективные по противоплесневой активности штаммы грибов.

Среди антагонистически активных штаммов *Fomitopsis* и *Trametes* Жилинская Н.В. выбрала для дальнейшего изучения и идентификации до вида 2 штамма *Fomitopsis* sp. и 1 штамм *Trametes* sp.

Детальная характеристика морфологических, физиологических и молекулярно-генетических свойств подтвердила принадлежность грибов к базидиомицетам с предварительной идентификацией культур как *Fomitopsis officinalis*, *F. pinicola* и *Trametes versicolor*. Точность видовой идентификации была проверена молекулярно-генетическими методами. По базе GenBank гомология испытанных штаммов с видами *Fomitopsis officinalis* и *F. pinicola* составляла, соответственно, 70 и 98%, а для *Trametes* sp. с видом *T. versicolor* – 99%.

Научную и биотехнологическую ценность имеют данные по культивированию базидиомицетов на разных питательных субстратах с определением показателей колонизации, скорости роста и накопления мицелия. Колонизация начиналась с первых суток после инокуляции. Наибольшей абсолютной скоростью роста на растительных субстратах обладали штаммы *Fomitopsis pinicola* Fp 04/99 и *Trametes versicolor* B 08/06. Продуктивность штаммов по выходу мицелия при статическом поверхностном жидкофазном выращивании на среде Maltax 10; ранее не использованной в исследованиях

и поэтому не востребованной в промышленности, была наибольшей у *Trametes versicolor* В 08/06 на 28 сутки (4,7 г/л). Однако выход мицелия при погруженном культивировании на среде Maltax 10 уже на 8 сутки (стационарная фаза) достигал 11.6 г/л.

Важной характеристикой грибов, способствующей антагонистическому действию, являются хитиная и целлюлазная активности, которые были установлены в культуральных жидкостях у всех 3 штаммов. Доминирующие хитиная и целлюлазная (12,4 ед/мл и 16,4 ед/мл, соответственно) активности отмечены у *Fomitopsis pinicola* Fr-04/99, а наименьшие у *Trametes versicolor* В 08/06 (9,1 ед/мл и 13,1 ед/мл, соответственно). Эти сведения открывают перспективу применения указанных штаммов в сельском хозяйстве (в кормопроизводстве, для биоконверсии).

Таким образом, первый вывод диссертации полностью подтвержден экспериментально.

Второй вывод обоснован данными по воздействию физических факторов - когерентного и некогерентного света, а также низкочастотного звука на рост 3-х выбранных штаммов базидиомицетов. Статистически достоверные различия в ростовых показателях между облученными и необлученными когерентным и некогерентным светом культурами выявлены при определенных условиях экспозиции только у *Trametes versicolor* В 08/06. Эффективное влияние акустических волн в слышимом диапазоне частот на среднесуточный прирост мицелия и величину ростовых коэффициентов также обнаружено у *Trametes versicolor*. Указанные физические факторы в пределах использованных характеристик, по-видимому, могут быть применены как стимуляторы при твердо- и жидкофазном промышленном культивировании мицелия. Следовательно, вывод можно считать доказанным.

Третий вывод связан с данными изучения биохимического состава и оценке безопасности 15-суточного мицелия 3-х перспективных для пищевой промышленности антагонистически активных штаммов базидиомицетов. Жилинской Н.В. установлено, что содержание общего белка было максимальным у *Fomitopsis pinicola* Fr-04/99 (26,2%). Количественная доля незаменимых аминокислот (лейцин, треонин, лизин), которая приведена в весовых единицах, оказалась наивысшей у *Trametes versicolor* В 08/06 (31,8%), а у штаммов *Fomitopsis* была около 23-24%.

Поскольку позитивный биологический эффект мицелия и плодовых тел базидиомицетов связан с присутствием полисахаридов, таких как β -глюканы, Жилинская Н.В. изучила количество трудногидролизуемых, легкогидролизуемых полисахаридов и β -глюканов в мицелиях 3-х штаммов. Установлено, что штамм *Trametes versicolor* В 08/06 имел наибольшее содержание углеводных компонентов (57,1%) и β -

глюканов (30,8 %). При этом количество трудногидролизуемых полисахаридов доминировало у всех штаммов (от 16,5 до 42,9%).

Биологическая ценность белка, которая определяется по его перевариваемости, изучена автором по пепсину и тирозину и имела наивысший показатель у *Trametes versicolor* В 08/06 (41,9% и 49,9%, соответственно), что соответствует данным, известным для других хитинсодержащих грибов. На установке «искусственный желудок» перевариваемость мицелия тирозин/г белка была для *F. officinalis* 23,7 мг, для *F. pinicola* 17,6 мг, для *T. versicolor* 15,9 мг. Следовательно, вывод 4 адекватен данным.

Четвертый вывод утверждает, что важнейшим свойством мицелия 3-х изученных штаммов являлась его пищевая безопасность, которую как 1 этап тестирования диссертант определяла с использованием водных и спиртовых экстрактов на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium caudatum*. Водные и спиртовые экстракты мицелия (экстракт:вода – 1:10) были нетоксичны: они не нарушали жизнеспособность обоих видов простейших. Следовательно, следует согласиться с доводами и выводом диссертанта, что по параметрам количества, перевариваемости белка, содержанию незаменимых аминокислот и полисахаридов, а также по невыявленной на первом этапе токсичности, мицелий всех 3-х штаммов базидиомицетов может быть использован для возможного получения функциональных пищевых продуктов и кормов.

Пятый вывод подвел итог цикла предыдущих экспериментов изучения мицелия 3-х штаммов базидиомицетов по многим показателям пищевой промышленности. Автором доказано, что среди них штамм *Trametes versicolor* В 08/06 имел наиболее позитивную комплексную активность. В связи с этим мицелий базидиомицета в виде измельченной пленки, полученной на жидкой среде Maltax 10 в течение 14 суток, Жилинская Н.В. испытала в составе колбасной продукции (ливерной колбасы) на его совместимость с другими компонентами. Вначале она изучила функционально-технологические свойства продукта и влияние препарата на основные показатели мясной системы (органолептические свойства, рН, водо- и жирудерживающая способность и т.д.). Автором предложена технологическая схема производства ливерной колбасы с добавкой оптимально установленного количества (2%) сухого мицелия *Trametes versicolor* В 08/06.

На заключительном этапе исследования в МГУПП были изготовлены 2 партии ливерных колбас (контрольная и экспериментальная с 2% мицелия). Это привело к некоторому замедлению процессов окисления и гидролиза в экспериментальном продукте. В целом отмечено, что после введения мицелия опытный образец имел более нежную консистенцию, более полноценную окраску и запах. Микробиологические показатели этого продукта соответствовали СанПиН 2.3.2 1078-01. Поэтому можно

согласиться с выводом автора о возможных рекомендациях по использованию мицелия *Trametes versicolor* В 08/06 при создании мясопродуктов.

Шестой вывод основан на результатах получения полимерного покрытия с противомикробной активностью, обусловленной мицелием *Trametes versicolor* В 08/06 или его культуральной жидкости (активная добавка). Биополимер получали после добавления грибного компонента к оптимальному водному объему метилцеллюлозы, стерилизовали и отливали в стерильных условиях пленку. Диссертант получила также пленку с жизнеспособным мицелием без стерилизации после инокуляции *T. versicolor* В 08/06 в раствор метилцеллюлозы с последующим культивированием. Гриб попадал либо в толщу субстрата, либо в виде отдельных вкраплений в пленку. При создании биополимерного покрытия было установлено, что сухой мицелий или культуральная жидкость *Trametes versicolor* не обеспечивали противоплесневых свойств, тогда как пленки метилцеллюлозы с культивированием жизнеспособного мицелия создавали противоплесневую устойчивость, не давая развиваться многим видам *Penicillium*. Аналогичные результаты по отсутствию противодействия микробной колонизации при включении в пленку сухого мицелия или культуральной жидкости были получены в отношении бактерий.

Так, пленки, полученные с культивированием базидиомицета в растворе метилцеллюлозы не колонизировались микроорганизмами (*S. aureus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *C. albicans*). Однако присутствие жизнеспособного мицелия влияло на вязкость раствора метилцеллюлозы. Поэтому культивировать штамм гриба следует в 5% водном растворе метилцеллюлозы, приближая реологические показатели к норме. Биопленку с фильтрами гриба автор успешно использовала для покрытия сухофруктов.

Результаты этих практических испытаний показали перспективность использования жизнеспособного, а не инактивированного автоклавированием, мицелия в составе биопленок в качестве защитного компонента пищевых продуктов от микробных контаминантов.

Таким образом, можно отметить соответствие последнего вывода результатам тестирования.

Все полученные данные, по которым сделаны адекватные выводы, по нашему мнению, имеют научную новизну или существенную практическую значимость. Об этом свидетельствует депонирование штамма *Trametes versicolor* во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов, патент на штамм, а также проект лабораторного регламента на противомикробный препарат «Микотрам» для мясоперерабатывающей промышленности.

Все основные этапы диссертации выполнены Жилинской Н.В. Фамилии и статус помощников приведены в разделе «Благодарности».

Основной материал диссертации отражен в реферате, в котором указана информация о публикациях, 4 из которых содержатся в изданиях, рекомендованных ВАК. Данные были также представлены на международных и российских конференциях.

При общей положительной оценке работы следует указать на некоторые технические погрешности (неточности написания, например, spp вместо sp, пропуски слов, повторы и т.д.). Целесообразно в доклад включить отсутствующие положения, которые диссертант выносит на защиту. Однако значительная научно-практическая значимость диссертации позволяет считать эти погрешности несущественными.

Заключение. Диссертация Жилинской Наталии Викторовны «Противомикробные свойства базидомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr) Bond. et Sing., *Fomitopsis pinicola* (SW.:FR.) P. Karst и *Trametes versicolor* (L.:Fr) Lloyd: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов» является научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук, профессора Громовых Татьяны Ильиничны и представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии). По актуальности темы, современному методическому уровню экспериментов, научной новизне и практической значимости полученных результатов, объему выполненных исследований, в которых получены научно обоснованные и статистически достоверные данные по изучению 3-х штаммов ксилотрофных базидомицетов родов *Fomitopsis* и *Trametes*, содержащих ценный белок, незаменимые аминокислоты, полисахариды, ферменты, антагонистически активных в отношении возбудителей порчи пищевых продуктов и перспективных для использования в пищевой промышленности, работа имеет существенное значение для биотехнологии и соответствует критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени

кандидата наук, а ее автор, Жилинская Н.В., заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии).

Официальный оппонент,

Заведующий лабораторией
микробиологических питательных сред
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
(105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а,
тел. +7 (495) 916-11-52, b.larus@mail.ru),
доктор биологических наук, профессор



Л.П. Блинкова

Подпись д.б.н., проф. Блинковой Л.П. заверяю.

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
кандидат биологических наук



Н.И. Андропова

7.04.2015г.

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертационной работе Жилинской Наталии Викторовны
 «Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. и
Trametes versicolor (L.: Fr.) Lloyd: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов» по специальности 03.01.06 –
 биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности	Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет
Блинкова Лариса Петровна	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова», заведующая лабораторией микробиологических питательных сред	Доктор биологических наук, профессор	03.02.03	1. Блинкова Л.П. Свойства некультивируемых и покоящихся форм микроорганизмов / Л.П. Блинкова, Ю.Д. Пахомов, Л.Г. Стоянова // Иммунология, аллергология, иммунопатология. – 2010. – №3. – С.67-76. 2. Пахомов Ю.Д. Роль некультивируемых форм неспорообразующих микроорганизмов в поддержании гомеостаза популяции / Ю.Д. Пахомов, Л.П. Блинкова, Л.Г. Стоянова // Иммунология, аллергология, иммунопатология. – 2010. – №4. – С. 57-66. 3. Блинкова Л.П. Бартоanelлы – возбудители бартоanelлезов человека. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская

				<p>микробиология и этиологическая диагностика инфекций / Л.П. Блинкова; под редакцией А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. – М.: Бинум, 2010. – С. 953-963.</p> <p>4. Юрков В.Б. Значение и биохимические свойства бактериоцинов / В.Б. Юрков, И.Э. Борисова, Л.П. Блинкова / Современные медицинские технологии. – 2011. – № 6. – С. 37 – 38.</p> <p>5. Pakhomov Yu.D. Experimental approach to the induction of nonculturable state of <i>Lactococcus lactis</i> / Yu. D. Pakhomov, S.K. Belus, L.P. Blinkova, L.G. Stoyanova, E.A. Ustyugova // Biochemistry and Biotechnology: Research and Development. Nova Science Publishers. Inc. New York, 2012.- P.45-50.</p> <p>6. Пахомов Ю.Д. Жизнеспособность условно-патогенных и сапротрофных микроорганизмов в условиях стресса / Ю.Д. Пахомов, Л.П. Блинкова, О.В. Никифорова // Вода: химия и экология. - 2012. - №12. - С. 45-49.</p> <p>7. Блинкова Л.П. Возбудитель</p>
--	--	--	--	---

				<p>внутрибольничной инфекции <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>. Руководство по медицинской микробиологии. / Л.П. Блинкова; под редакцией А.С. Лабинской, И.Н. Костоковой - М.: Бинوم, 2013. - Т. 3. - 752с. - Глава 1.11 - С.369-382 - ISBN 978-5-9518-0536-2.</p> <p>8. Мороз А.Ф. Бактерии рода <i>Pseudomonas</i>. Руководство по медицинской микробиологии / А.Ф. Мороз, Л.П. Блинкова; под редакцией А.С. Лабинской, И.Н. Костоковой - М.: Бином, 2013 - Книга III, том 1. - 752с. - Глава 1, раздел 1.9 - С.306-348 - ISBN 978-5-9518-0536-2.</p> <p>9. Блинкова Л.П. Микроскопические грибы - возбудители оппортунистических инфекций. Руководство по медицинской микробиологии / Л.П. Блинкова; под редакцией А.С. Лабинской, И.Н. Костоковой - М.: Бином, 2013 - Книга III, том 1. - 752с. - Глава 3, раздел 3.1, С. 474-503, подраздел 3.4.5, С. 617-621 - ISBN 978-5-9518-0536-2.</p> <p>10. Блинкова Л.П. Обнаружение некультивируемых форм</p>
--	--	--	--	---

- бактерий в лиофилизированных препаратах пробиотиков / Л.П. Блинкова, Ю.Д. Пахомов, О.В. Дмитриева // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 2013. – №3. – С. 83-88.
11. Blinkova L.P Chapter 1. Express Assessment of Cell Viability on Biological Preparations/L.P. Blinkova, Yu.D. Pakhomov, O.V.Nikiforova, V.F. Evlaskina, M.L. Altshuler // Pharmaceutical and Medical Biotechnology. New Perspectives. Ed by R. Orlicki, C. Cienciala, L.P. Krylova, J. Prielichowski and G.E. Zaikov. Nova Science Publishers. - New York, 2013. - P. 1-4.
12. Blinkova L.P Comparative Evaluation of Viability of Cells of Probiotic Strains by Luminescence Microscopy and Flow Cytometry / L.P. Blinkova, Yu.D. Pakhomov, O.V. Dmitrieva, R.V. Zhelankin, E.A. Akhmatov // Research Progress in Chemical Physics and Biochemical Physics.- Nova Science Publishers. - 2014. - P.399-403. - ISBN 978-6-3117-066-9 Inc.

					<p>13. Блинкова Л.П., Горбатко Е.С., Пахомов Ю.Д., Поликарпова С.В., Альтшулер М.Л. Поиск продуцентов бактериоцинов среди клинических штаммов <i>Candida</i>. //Проблемы медицинской микологии – 2014. Т. 16. - №2. - С. 46-47.</p> <p>14. Pakhomov Yu.D. Nonculturability and Nisin Production of <i>Lactococcus Lactis</i> / L.P. Blinkova, Yu.D. Pakhomov, O.V. Dmitrieva, O.S. Berdyugina, L.G. Stoyanova // J. Bacteriol and Parasitol. – 2014. - doi: 10.4172/2155-9597.1000178.1000.178.8pp.</p>
--	--	--	--	--	---

Зав. лабораторией микробиологических питательных сред Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» д.б.н., профессор b.lagus@mail.ru, 89161542804

Подпись Блиновой Ларисы Петровны заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» кандидат биологических наук



Л.П. Блинкова




Н.И. Андропова

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Жилинской Наталии Викторовны «Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bond. Et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.:Fr.)P.Karst и *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Lloyd: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Базидиальные грибы прочно вошли в число популярных, хотя и сложных объектов активных биотехнологических исследований, направленных на получение пищевых продуктов, включая биологически активные добавки, ферментных и лекарственных препаратов. Это связано, как с установлением способностей базидиомицетов к образованию широкого спектра пищевых, биологически активных и хозяйственно ценных метаболитов и разработкой подходов к направленной регуляции их биосинтетической деятельности, так и с возрастающими возможностями современной биотехнологии.

В связи с этим не вызывает сомнения **актуальность** работы Н.В.Жилинской, посвященной экспериментальному обоснованию возможных путей использования в технологии пищевых продуктов трех видов базидиальных ксилотрофных грибов *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Trametes versicolor*. Ориентируясь на будущее практическое использование результатов диссертационной работы, автор концентрируется на трех возможных направлениях использования изучаемых культур, а именно в качестве добавок при производстве мясопродуктов и их полимерных покрытий, при производстве кормов.

Диссертационная работа Н.В.Жилинской изложена на 195 страницах, иллюстрирована 34 рисунками и 20 таблицами. В работе процитировано 267 источников, включая 141 на иностранных языках. Структурно диссертация разделена на введение, обзор научной литературы, описания объектов и методов работы, 5 глав результатов работы, заключения, выводов и 9 приложений.

В обзоре литературы автор очерчивает круг представителей микро- и микобиоты, представляющих угрозу безопасности пищевых продуктов и кратко приводит основные направления борьбы с возможными контаминантами. Говоря о биологических методах защиты пищевых продуктов, Н.В.Жилинская перечисляет используемые виды бактерий и грибов. На наш взгляд этот раздел следовало усилить описанием известных и возможных механизмов защитного действия этих видов и, тем самым, конкретизировать те необходимые свойства, выявлению которых посвящена большая часть диссертационной работы. Основной объем обзора литературы отведен описанию биологии, морфологии и биосинтетическим возможностям изучаемых видов, что помогает читателю составить представление об объектах настоящей работы. Автор достаточно подробно останавливается на биологически активных метаболитах, продуцируемых изучаемыми видами и перспективных для использования в биомедицине и биофармацевтике. Однако хотелось бы видеть более четкую границу между лекарственными препаратами и биологическими добавками к пище. Вероятно, обзор литературы выиграл бы, если бы была приведена информация о существующих грибных добавках в пищевые, прежде всего мясные, продукты, а также об использовании грибов при получении покрытий для продуктов питания. В обзоре литературы Н.В.Жилинская также описывает существующие

способы культивирования базидиальных грибов и методы интенсификации их роста. Обзор литературы диссертант заканчивает обоснованием актуальности и целесообразности проведенной работы.

Раздел «Объекты и методы» написал добротнo и позволяет составить впечатление о том широком наборе экспериментальных методов, который использован при выполнении диссертационной работы. Широта экспериментальной проработки проблемы и разнообразие освоенных методов являются безусловным достоинством работы. К недочетам этого раздела следует отнести использование коэффициента 6,25 при расчете содержания белка по содержанию общего азота, отсутствие прямой или косвенной информации о количестве нанесенного на бумажный диск испытуемого при анализе антибиотической активности препарата, и упорное использование термина «спиртовой экстракт» вместо «этаноловый экстракт».

Глава «Исследование антагонистической активности штаммов базидиомицетов *Fomitopsis* и *Trametes*». Сразу отметим, что в названии главы не хватает слова «видов». Экспериментальный материал, суммированный в этой главе можно разбить на две основные группы. Во-первых, это исследование антибиотической активности изучаемых штаммов грибов, осуществленное традиционными методами с использованием этаноловых и водных экстрактов мицелия и культурального фильтрата. Основа этого раздела - широкий скрининг штаммов изучаемых видов с целью отбора наиболее эффективных антибиотикообразователей, активных в отношении бактерий и грибов, являющихся причиной порчи пищевых продуктов. Результаты скрининга позволили автору осуществить предварительный отбор перспективных для решения поставленных задач штаммов грибов. Во-вторых, это более глубокое изучение влияния на штаммы грибов рода *Penicillium* как метаболитов отобранных ранее штаммов базидиомицетов, так и непосредственно самих живых культур. Следует подчеркнуть практическую важность этого раздела, поскольку в качестве тест-объектов были использованы не коллекционные штаммы грибов рода *Penicillium*, а культуры, выделенные с поверхности пищевых продуктов и из помещений для хранения продукции. Автор выявил высокую миколитическую активность ряда исследуемых культур базидиомицетов, которая возрастала в течение экспериментов, проведенных с использованием метода встречного посева. Отмеченное при увеличении продолжительности эксперимента возрастание активности, на наш взгляд, объясняется тем, что ферменты, обеспечивающие искомую активность, являются индуцибельными. Результаты, полученные при выполнении данного раздела работы, позволили в дальнейшем сконцентрировать внимание на 3-х отобранных штаммах, два из которых принадлежали роду *Fomitopsis*, а один – роду *Trametes*.

Глава, посвященная изучению культурально-морфологических и молекулярно-генетических свойств отобранных штаммов, логично продолжает изложение экспериментального материала. Описание культурально-морфологических характеристик отобранных штаммов проведено с использованием достаточно широкого набора плотных питательных сред. Подобный раздел работы является необходимым при использовании новых штаммов грибов, однако перед исследователем всегда встает непростая задача структурировать полученные результаты. Наиболее убедительные выводы этой части работы заключаются в рекомендации плотных питательных сред, достаточно полно отвечающих трофическим потребностям отобранных штаммов. Вместе с тем, надо отметить перегруженность таблиц, в которых одновременно приведены и показатели

отметить перегруженность таблиц, в которых одновременно приведены и показатели скорости линейного роста, и значения ростового коэффициента, что существенно затрудняет восприятие материала. По нашему мнению, ростовой коэффициент, как критерий роста мицелиальных культур на плотных средах в принципе трудно поддается интерпретации, поскольку объединяет в формуле своего расчета результаты, как точного, так и весьма приблизительного измерения, а также абсолютно субъективный фактор. Приведенные фотографии существенно проигрывают из-за своего малого размера, это снижает их информативность. На микрофотографиях не указано использованное увеличение. Вторая часть данной главы содержит результаты молекулярно-генетических исследований, проведенных с целью видовой идентификации отобранных штаммов. Наличие этого раздела в работе свидетельствует о владении автором современными методами исследования, умении обрабатывать полученные результаты. Однако трудно согласиться с содержащимся в преамбуле мнением, что результаты исследований культурально-морфологических и микроскопических свойств штаммов позволили предварительно идентифицировать их до вида. Надо полагать, что предварительная идентификация была проведена при выделении чистых культур из плодовых тел, морфологические признаки которых служат критериями определения грибов. Поэтому желательно было бы указать использованные для этой цели определители. В целом результаты классического определения и молекулярно-генетических исследований совпали и позволили отнести отобранные штаммы к видам *Fomitopsis officinalis*, *F. pinicola* и *Trametes versicolor*. В этой же главе содержатся разделы, посвященные твердофазному культивированию и выращиванию на жидких питательных средах в стационарной и погруженной культуре, а так же оценке целлюлазной и хитиназной активности. Обращает на себя внимание штамм *T. versicolor*, выход погруженной биомассы которого в неоптимизированных условиях и без стадии получения жидкого посевного мицелия составил около 11 г/л. Поскольку оптимизация условий погруженного культивирования базидиомицетов обычно приводит к двукратному увеличению продуктивности процесса, можно предположить, что выход биомассы этого штамма может быть увеличен до 20-25 г/л. Обосновывая возможность использования штаммов рода *Fomitopsis* для производства кормов, автор справедливо делает основной акцент на целлюлазной активности исследуемых штаммов. Нельзя не согласиться с Н.В.Жилинской, объясняющей антагонистическую активность изучаемых штаммов наличием способности к синтезу необходимых ферментов. Однако следовало бы уточнить, что антигонистическая активность связана не только с активным синтезом хитиназ. Штамм *T. versicolor* значительно уступал другим культурам в хитиназной активности, однако проявил себя в качестве эффективного антагониста грибов рода *Penicillium*.

В главе 5 автор приводит результаты исследования воздействия, оказываемого физическими факторами на рост трех отобранных штаммов. В качестве физических факторов использованы оптические излучения и акустические волны. Автором предложены условия обработки культур базидиомицетов исследуемыми факторами, обеспечивающие активизацию ростовых процессов, что, несомненно, имеет существенное практическое значение, поскольку базидиальные грибы в целом обладают невысокими скоростями роста. Повышение эффективности микотехнологий, в том числе за счет повышения выхода биомассы, представляет собой актуальную задачу современной биотехнологии, от успешного решения которой во многом будут зависеть результаты их

практического использования. Отмеченный факт образования примордиев при обработке культур базидиомицетов светом вполне ожидаем, так как свет является триггером процесса плодообразования. Хотелось бы знать мнение автора, на какой стадии биотехнологического процесса получения биомассы базидиомицетов целесообразно применить предложенные способы обработки культур с учетом специфики биотехнологического оборудования.

В следующей главе автор суммировал результаты биохимического изучения вегетативного мицелия отобранных штаммов. Определение состава аминокислот в белках выявило наличие всех незаменимых аминокислот за исключением триптофана. Отмечено высокое содержание таких незаменимых аминокислот, как лейцин, треонин, лизин. Изучение перевариваемости белка, проведенное с помощью аппарата «искусственный желудок», показало, что перевариваемость грибного белка превышает аналогичный показатель растительного белка. В дальнейшем сравнение значений перевариваемости изучаемых культур и других штаммов базидиомицетов следовало бы расширить за счет упоминания принадлежности базидиомицетов к съедобным или несъедобным грибам (последние формируют не содержащее ядовитых веществ, но очень жесткое по консистенции плодовое тело). Штамм *T. versicolor* отличался от других исследованных штаммов тем, что в общем пуле глюканов у него преобладали β -глюканы, которые, как известно обладают большей биологической активностью по сравнению с α -глюканами. Предварительное изучение токсикологических свойств мицелия отобранных штаммов с использованием культур простейших показало отсутствие негативного действия на культуру *Tetrahymena pyriformis*.

Полученные доказательства того, что мицелий штамма *T. versicolor* можно рассматривать, как источник питательных веществ, послужили основой для разработки рецептуры и технологической схемы производства ливерной колбасы. Положительные результаты дегустации полученного продукта приведены в приложении 8. На наш взгляд целесообразно было бы указать, является ли эта разработка первым примером использования мицелия трутовых грибов в качестве добавки в пищевые продукты (за исключением, разумеется, биологически активных добавок к пище).

Другим направлением практического отобранного штамма *T. versicolor* стала разработка состава полимерного покрытия для пищевых продуктов. Автором апробировано использование двух подходов к решению поставленной задачи – введение в состав покрытия инактивированного мицелия, в том числе с добавлением культурального фильтрата, или добавление в покрытие жизнеспособного мицелия. В результате Н.В.Жилинской предложен оригинальный метод получения исходного материала для формирования полимерных пленок с жизнеспособным мицелием *T. versicolor*, а именно культивирование штамма базидиомицета в водном растворе метилцеллюлозы – основного ингредиента пленки. Автор представляет четкие доказательства преимуществ полимерной пленки с жизнеспособной культурой *T. versicolor*, заключающиеся в ее способности ингибировать развитие грибов рода *Penicillium*.

Суммируя сказанное выше, нужно подчеркнуть, что основное научное достижение Н.В.Жилинской заключается в выявлении перспективного штамма *T. versicolor*, обладающего обозначенными в поставленных задачах свойствами, в получении доказательств целесообразности его использования в технологиях пищевых производств. Это свидетельствует о том, что рассматриваемая работа соответствует критерию **научной**

новизны. Практическая ценность работы логически вытекает из ее новизны и включает предложенные диссертантом составы продуктов, методы и технологические схемы использования отобранных культур для получения пищевых продуктов, полимерных покрытий, а также кормов для сельскохозяйственных животных. Практическая ценность диссертационной работы подтверждена патентом РФ на изобретение и лабораторным регламентом на производство противомикробного препарата «Микотрам».

Диссертационная работа Н.В.Жилинской отличается использованием очень широкого набора разнообразных экспериментальных методов, адекватных поставленным задачам. Это подтверждает высокую квалификацию диссертанта. Результаты, полученные в экспериментах, **достоверны**, сформулированные на основе их анализа основные положения и выводы диссертации **обоснованы**.

Вместе с тем, высоко оценивая в целом диссертационную работу Н.В.Жилинской, следует признать, что она не лишена недочетов. В связи с этим хотелось бы задать вопросы и сделать замечания.

Вопросы.

1. Оказывает ли влияние жизнеспособный мицелий *T. versicolor*, содержащийся в полимерной пленке, на качество пищевого продукта в процессе хранения?
2. Каким образом выявленная целлюлазная активность штаммов может обуславливать их антагонистические свойства, как об этом утверждается в работе?

Замечания.

1. В работе присутствуют неудачные выражения: термин «ткань» по отношению к базидиомиетам (с.22), «из ... базидиомицетовых грибов» (с. 31), «штаммы в биомассе мицелия синтезируют» (с. 51), «наиболее оптимальные» (с.91) и др.
2. В тексте диссертации не всегда соблюдается правило сокращения название рода при повторном упоминании латинского названия вида, не указано, что *Trametes versicolor* является синонимом *Coriolus versicolor*.
3. Отдельно хотелось бы упомянуть техническую погрешность в автореферате, заключающуюся в применении термина «диплоидный» вместо термина «дикариотический» (с. 12). В тексте диссертационной работы термины применены корректно.
4. На наш взгляд решение автора вынести объемный экспериментальный материал (в виде таблиц) в приложение не является удачным и в определенной мере затрудняет ознакомление с работой.

Указанные недочеты носят преимущественно формальный, а не сущностный характер, не влияют на высокую оценку диссертационной работы Н.В.Жилинской и скорее представляют собой пожелания для дальнейшей работы.

По результатам проведенного исследования диссертантом опубликовано 16 печатных работ, включая 3 статьи в журналах списка ВАК, получен 1 патент на изобретение.

Текст автореферата в полной мере отражает выполненную работу и соответствует тексту диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Н.В.Жилинской «Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bond. Et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.:Fr.)P.Karst и *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Lloyd: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов», представляет собой законченную научно-квалификационную работу, по актуальности темы, объему и достоверности полученных

результатов, их научной новизне и практической значимости, по обоснованности основных положений и выводов диссертации соответствующую требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013 года, № 824. Автор Наталия Викторовна Жилинская заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией биосинтеза биологически активных веществ
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»,
119021, Москва, ул. Большая Пироговская, дом 11
Телефон: (499)2469980, факс:(499)2450295
e-mail:lkrasnopolskay@yandex.ru
доктор биологических наук
09.04.2015

Л.М.Краснопольская

Подпись Л.М.Краснопольской заверяю,
зав. отделом кадров Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»
09.04.2015г.



В.А.Гольцова

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертационной работе Жилинской Наталии Викторовны
 «Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. и
Trametes versicolor (L.: Fr.) Lloyd: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов» по специальности 03.01.06 –
 биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности	Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет
Краснопольская Лариса Михайловна	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», заведующая лабораторией биосинтеза биологически активных веществ	Доктор биологических наук	03.00.24 – микология 03.00.23 - биотехнология	1. Автономова А.В., Баканов А.В., Винокуров В.А., Бухман В.М., Краснопольская Л.М. Противоопухолевые свойства погруженной биомассы <i>Hericium eritaseus</i> // Башкирский химический журнал, 2011. – Т. 18. - № 4. – С. 102-106. 2. Л.М.Краснопольская , А.В.Автономова, О.Н.Щегловитова, П.А.Гушин. Погруженное культивирование <i>Ganoderma lucidum</i> и интерферониндуцирующие свойства эндополисахаридов гриба. // Башкирский химический журнал, 2012, - Т. 19. - № 4. – С. 83-88. 3. Краснопольская Л.М. , Н.Ю.Кац, А.И.Усов,

					<p>А.В.Барков, В.А.Винокуров. Погруженное культивирование штамма базидиомицета <i>Lentinus</i> <i>edodes</i> с широким спектром биологической активности. // Антибиотики и химиотерапия, 2012. – Т. 57. - № 9-10. – С. 3-7.</p> <p>4. А.В.Автономова, Л.М.Краснопольская. Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства трутовика лакированного (<i>Ganoderma</i> <i>lucidum</i>) // Микология и фитопатология, 2013. – Т. 47. – Вып. 1. – С. 3-11.</p> <p>5. Автономова А.В., Ярина М.С., Краснопольская Л.М. Препараты на основе полисахаридов базидиальных грибов: клинические испытания (обзор литературы) // Вестник РАЕН, 2014. - № 5. – С. 102-108.</p> <p>6. Автономова А.В., Краснопольская Л.М. Противовирусные свойства метаболитов базидиальных</p>
--	--	--	--	--	---

					грибов// Антибиотики и химиотерапия, 2014, - № 7-8. – С.41-48.
--	--	--	--	--	--

Заведующая лабораторией биосинтеза биологически активных веществ
 Федерального государственного бюджетного научного учреждения
 «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»,
 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, дом 11
 Телефон: (499)2469980, факс:(499)2450295
 e-mail:lkrasnopolskay@yandex.ru
 доктор биологических наук
 09.04.2015



Краснопольская Лариса Михайловна

Подпись Л.М.Краснопольской заверяю,
 зав. отделом кадров Федерального государственного
 бюджетного научного учреждения
 «Научно-исследовательский институт
 по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»
 09.04.2015



В.А.Гольцова