

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Васишин Роксолани Василівни на тему: „Конструювання поліпшених продуцентів етанолу та глутатіону у дріжджів *Ogataea polymorpha*”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Актуальність дисертації. Етанол та глутатіон – промислово важливі природні сполуки, що виробляються за допомогою мікробного синтезу у масштабі мільйонів тисяч та близько тисячі тон, відповідно. Етанол – центральний елемент індустрії біопалива. Глутатіон важливий для медичної, косметичної та харчової промисловостей. Враховуючи масштаб виробництва цих сполук, навіть незначне підвищення рівнів їхньої продукції мікробами матиме значний економічний ефект. У своїх спробах поліпшити продукцію етанолу Роксолана Василівна зупинилася головно на маніпулюваннях імпортом ксилози – етап ферментації, що був малодослідженим в неконвенційних дріжджах. Тому тема дисертаційної роботи Васишин Р.В. – актуальна, має важливе теоретичне та практичне значення. Зокрема, застосування *Ogataea polymorpha* для продукції етанолу має ключову перевагу застосування технології одночасної сахарифікації та ферментації субстрату (SSF).

Зв'язок з державними чи галузевими науковими програмами. Робота дисертантки є частиною низки бюджетних і грантових досліджень Інституту біології клітини НАН України. Це гранти «Застосування метаболічної інженерії метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* для покращення алкогольної ферментації альтернативних джерел вуглецю (ксилози та гліцерину)» (№ держреєстрації 0114U000592, 2013-2017); «Комп'ютерне моделювання *in silico* як основа раціональної метаболічної інженерії дріжджів *Hansenula polymorpha* для поліпшення параметрів високотемпературної алкогольної ферментації ксилози» - проект № 6188 спільного конкурсу НАН України та Українського науково-технологічного центру (№ держреєстрації 0116U006364, 2015-2017); «Генетичні та біохімічні аспекти регуляції деяких катаболічних та анаболічних процесів у мікроорганізмів: алкогольна ферментація, катаболізму метанолу, біосинтезу флавінів, гліцерину, водню та глутатіону» (№ держреєстрації 0116U002209, 2018-2020); цільової програми наукових досліджень НАН України «Біопаливні ресурси і біоенергетика» (№ держреєстрації 0118U006196, 2018-2022). Окремі розділи дисертаційної роботи виконувалися у рамках індивідуального гранту «Engineering of xylose transporters in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha* for improvement of alcoholic fermentation», FEMS-GO-2018-225. Авторка дисертаційної роботи є однією із виконавиць вищезгаданих науково-дослідних тем.

Новизна дослідження. За допомогою методів генетичної інженерії розроблено нові способи підвищення ефективності утворення етанолу II-го покоління та глутатіону у дріжджів *O. polymorpha*. Кілька підходів, які раніше

використовувались для низькоафінних транспортерів глюкози у *S. cerevisiae*, вперше були успішно застосовані для транспортера Hxt1 *O. polymorpha* з метою поліпшення споживання ксилози. Вперше виконано дослідження механізму регуляції біосинтезу глутатіону за рахунок посилення експресії гена *MET4* із використанням штаму-реципієнта з посиленою експресією гена *GSH2* в *O. polymorpha*.

Теоретичне і практичне значення результатів досліджень. Результати дисертаційного дослідження становлять інтерес як перша спроба використати гени транспортування для маніпуляцій рівнем етанолу в неконвенційних дріжджів. Робота вперше показує, що маніпулювання векторним метаболізмом пентоз може слугувати методом удосконалення штамів. З практичної точки зору, дисертантом вже отримано одні з найвищих рівнів накопичення етанолу і глутатіону для досліджуваного штаму.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація є цілісним дослідженням, її мета і завдання чітко сформульовано. Васишин Р. В. застосувала у своїй роботі сучасні методи мікробіології, генетичної та інженерії, аналітичної біохімії, біоінформатики. Положення, сформульовані в роботі, проілюстровані великою кількістю таблиць і рисунків (35), і вони спираються на цитування 195 сучасних джерел наукової літератури, головно англійської. Результати опрацьовано статистично та обговорено з урахуванням сучасної наукової літератури. Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Висновки, зроблені здобувачкою, логічно випливають з отриманих результатів. Тому достовірність положень та висновків й рекомендацій, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Матеріали дисертації сповна відображено у публікаціях. Зокрема, за темою дисертації опубліковано 4 статті у закордонних виданнях, що входять до наукометричної бази Scopus і мають імпаکت-фактор. Здобувачка презентувала свою роботу на багатьох міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах і симпозіумах.

Зауваження щодо дисертації:

1. Робота головно зосереджена на вдосконаленні продукції етанолу II-го покоління; можливо, тоді варто це було вказати у назві дисертації, як-от “Конструювання поліпшених продуцентів етанолу II-го покоління....”?
2. Є певні неточності в термінології і оформленні. Так, стор. 54, ген *MET14* кодує аденілсульфат кіназу, а не аденілсульфат кіназу.
3. У роботі представлені результати qPCR, у вигляді діаграм, але незрозуміла ціна планки похибок.
4. На деяких рисунках (3.17А, 3.18, 3.23, 3.29, 3.30) немає планок похибок, або ж вони зливаються із середнім значенням. За відсутності згадки про значення планки похибок під рисунками неможливо зрозуміти, як тлумачити певні дані.

5. В методах і в результатах дисертації немає згадки про верифікацію плазмід з точковими заміщеннями методами секвенування ДНК.

Наскільки здобувачка впевнена, що використані конструкції не містять сторонніх генетичних перебудов?

Зазначені недоліки стосуються головно оформлення дисертації, не впливають на висновки роботи та не знижують її високої оцінки.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані для створення біотехнологічних продуцентів етанолу II-го покоління та глутатіону.

Висновок про відповідність дисертації вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника Виходячи з вищенаведеної оцінки дисертації, вважаю, що за актуальністю теми, науковою новизною, важливістю і значенням отриманих результатів для теорії й практики, високим методичним рівнем проведених фундаментальних досліджень, широким висвітленням їх у фахових виданнях та матеріалах наукових форумів, зв'язком з державними програмами та іншими позитивними якостями вона відповідає вимогам п. 11, 12 Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567,, а її автор, Василишин Роксолана Василівна, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю – 03.00.07 – мікробіологія.

5 грудня 2020 р.

Доктор біологічних наук,
професор кафедри генетики та біотехнології
Львівського національного університету
імені Івана Франка

Б.О. Осташ

Підпис Б.О. Осташа засвідчую:
вчений секретар ЛНУ імені І. Франка, доц.



О.С. Грабовецька