

ВІДГУК

Офіційного опонента доктора медичних наук, професора

Корнійчук Олени Петрівни

на дисертаційну роботу Андрєєвої Юлії Андріївни

«Механізми дії нових регуляторних факторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність обраної теми дисертації

Виробництво біологічно активних речовин є надважливим державним питанням, актуальною галуззю, як для медицини, так і ряду інших важливих галузей народного господарства. Опрацювання нових підходів та створення оптимальних умов для одержання вітамінів, амінокислот, цінних органічних речовин визначає сьогодні практичні завдання мікробіологічної науки. Рибофлавін (вітамін В₂, або лактофлавін), який є попередником флавінових кофакторів флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду є ключовою сполукою в окисно-відновних процесах всіх аеробних форм життя. Надходження в організм вітаміну В₂ повинно забезпечуватися продуктами харчування. За умов недотримання збалансованого харчування, що супроводжується дефіцитом рибофлавіну в організмі людини чи тварин виникає ризик розвитку ряду патологічних станів. Тому у виробництві рибофлавіну мають потребу як медицина, так і ветеринарія, а також тваринництво та харчова промисловість.

Оскільки біотехнологічне виробництво, безперечно, має значні переваги над хімічним синтезом, продовжується пошук створення оптимальних умов для одержання рибофлавіну. Відомі на сьогодні мікроорганізми – промислові штами-продуценти рибофлавіну мають ряд недоліків. Модифікація генома дріжджів як найбільш зручного об'єкта для дослідження, з метою одержання стабільного надпродуцента рибофлавіну визначило напрямок наукової роботи Андрєєвої Юлії.

В умовах економічної кризи і зростаючих потребах у виробництві цінних біологічно активних речовин створення і використання вітчизняних технологій є надважливим питанням, а тема дисертаційної роботи – гостро актуальною.

Наукова новизна

У дисертаційній роботі вперше показано позитивний ефект дерепресії гена 6-фосфоглюконатдегідрогенази на синтез вітаміну В₂ флавіногенними дріжджами.

Вивчаючи процес синтезу дріжджами рибофлавіну, дисертант дослідила принципи дії нових чинників, задіяних до його продукції. Вдалося довести регуляторний вплив гена *IMA1*, а також дослідити вплив температурного фактора на продукцію рибофлавіну. Вивчено питання впливу промоторів гена *SEF1* із різних, флавіногенних та нефлавіногенних видів дріжджів на індукцію утворення рибофлавіну. Науковою новизною є також дослідження локалізації білка-екскретази Rfe1 (RiboFlavinExcretase) у дріжджів *C. famata*.

Практичне значення

Шляхом застосування методів метаболічної інженерії показано можливість підвищення рівня синтезу рибофлавіну. Зокрема, шляхом ймовірного підвищення рівня синтезу рибулозо-5-фосфату – попередника рибофлавіну, а також шляхом дослідження впливу генетичних регуляторів і модифікації середовища для вирощування трансформантів.

Оцінка змісту дисертації

Повнота викладання основних наукових положень та висновків в опублікованих наукових працях. Основні результати дисертації опубліковано у 10 працях, з яких 4 статті у виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus (у двох виданнях Q2 та одна праця у виданні Q4), 7 тезах доповідей у матеріалах конференцій, з'їздів та конгресів.

Структура та обсяг дисертації

Структура дисертації відповідає загально прийнятому формату і складається із вступу, огляду літератури, розділу з описом власних досліджень з їхнім обговоренням, розділу аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, трьох додатків. Автором подано також перелік умовних скорочень. Матеріали дисертації викладено на 133 сторінках друкованого тексту, ілюстровані 20 рисунками, вісьмома таблицями та однією формулою. Список використаної літератури налічує 193 джерел літератури.

Аналіз змісту дисертаційної роботи

В «Огляді літератури» подано процес синтезу рибофлавіну з порівняльним описом в еубактерій, архей, грибів та рослин. Показано, що у рослин процеси синтезу

рибофлавіну складаються з аналогічних стадій, як і у прокаріот, відмінність іншої послідовності реакцій – у цвілевих грибів. Схема біосинтезу рибофлавіну та флавінових коферментів у мікроорганізмів відтворена на рис.1.2. Відмічено, що флавіногенез у дріжджів є близьким до відповідного процесу у бактерій і відрізняється порядком дезамінування та відновлення рибози піримідинових інтермедіатів. Автором проаналізовано результати досліджень генетичного контролю біосинтезу рибофлавіну у бактерій та флавіногенних дріжджів, якими вважають групу видів, що надпродукують рибофлавін в умовах дефіциту заліза.

Дисертант вивчила як так звані класичні у цій галузі наукові праці, так і праці останніх років. Зниження рівня поживних речовин призводить до надсинтезу рибофлавіну і процесу спороутворення у флавіногенних грибів. Встановлення залежності флавіногенезу у *Ashbya gossypii* від температури дало змогу висунути гіпотезу щодо підвищення активності процесу за умов зниженої температури (під час припинення росту). У дисертації проаналізовано також пентозофосфатний шлях перетворення глюкози у синтезі рибофлавіну, що визначило пентозофосфатний шлях як один із найбільш цільових шляхів у метаболічній інженерії. Дисертантом детально вивчено досвід методів конструювання продуцентів рибофлавіну у дріжджів на моделях нефлавіногенних дріжджів, штамів-надпродуцентів та неконвенційних дріжджів. Це дало змогу у підсумку визначитися з чинниками регуляції флавіногенезу та напрямками метаболічної інженерії та селекції поліпшених продуцентів рибофлавіну на основі флавіногенних та нефлавіногенних дріжджів.

У розділі «Матеріали і методи» визначено також необхідні матеріали і штами мікроорганізмів, відповідні генетичні інструменти (плазміді, праймери), засоби для культивування дріжджів. Подано опис біохімічних та основних молекулярно-генетичних методів, необхідних для одержання найбільш продуктивних надпродуцентів рибофлавіну.

У розділі «Результати досліджень та їх обговорення», ґрунтуючись на тому, що пошкодження гена *IMA1*, що кодує вакуолярну АТФазу, спричиняє надсинтез рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Meyerozyma guilliermondii* (*P. guilliermondii*), наявності подібного ефекту *A. gossypii*, а також деяких інших наукових фактів, було припущено, що введення відповідних мутацій у дріжджі *C. famata*, може позитивно вплинути на синтез рибофлавіну. У розділі 3.1. описано процес конструювання касети для делеції гена *IMA1* 5'. Як селективний маркер використано ген стійкості до антибіотика флеоміцину *ble* з *Staphylococcus aureus* з використанням відповідної

технології набуття цієї ознаки. Подано на рисунку схему інтеграції делеційної касети у геном *C. famata* з праймерами для ПЛР-верифікації та праймерами для клонування частин гена *IMA1*. Серед 46 отриманих трансформантів лише один містив мутацію гена *IMA1*. Внесену мутацію було підтверджено за допомогою ПЛР з використанням пари специфічних праймерів для визначення 5' та 3'-фрагментів делеційної касети. Вдалося досягти зменшення накопичення біомаси у 2,8 рази порівняно з батьківським штамом L20105 та збільшення накопичення рибофлавіну (9,4-разове підвищення), підтверджено, що рівень синтезу рибофлавіну у дикого штаму також нижчий, ніж у *uma1Δ* мутанта. Показано, що для флавіногенних дріжджів надпродукція рибофлавіну постає захисним фактором у відповідь на стресові умови, зокрема, при видаленні гена, що кодує вакуолярну АТФ-азу, активність якої забезпечує кисле значення рН всередині органел центральної вакуолярної системи.

Дисертантом було здійснено спробу одержання штамів із делецією цього гена в існуючих надпродуцентів рибофлавіну BRP та AF-4.

У роботі вдало використано метод філогенетичного аналізу, який дав змогу шляхом побудови філогенетичного дерева за геном *SEF1* *C. famata* та інших дріжджів показати філогенетичну спорідненість між *SEF1* флавіногенних дріжджів та *SEF1* *C. tropicalis*.

Шляхом опрацьованої технології було перевірено також здатність продукувати рибофлавін в умовах дефіциту заліза.

У підрозділ 3.2. подано опис конструювання набору касет для дослідження можливої видоспецифічної регуляції транскрипції гена *SEF1* (дисертант на рисунку подала кільцеву схему плазмиди pNTC/SEF1pr_Cf/Ca/Ct/Ps/Sc: *NTC* (*DhSAT1*) з геном резистентності до норзеотрицину.

Виявлено, що промотори *SEF1* із флавіногенних дріжджів *C. albicans* та нефлавіногенних дріжджів *C. tropicalis*, злиті з ВРЗ гена *SEF1* із *C. famata*, впливають на здатність до відновлення надпродукції рибофлавіну у *sef1Δ* (підрозділ 3.2.1). Дисертантом доведено, що синтез рибофлавіну штамми, у яких експресія гена *SEF1* відбувається під контролем промоторів із дріжджів *C. famata*, *C. albicans* та *C. tropicalis* зростає, порівняно із штамом L20105 у 18,8; 19,4 та 13,5 разів, відповідно.

Експериментально зафіксовано також, що штамми із промоторами *SEF1* з флавіногенних дріжджів здатні до надсинтезу рибофлавіну.

При дослідженні ролі генів ферментів окиснювального етапу ПФШ у біосинтезі рибофлавіну (підрозділ 3.3.) було визначено вплив надекспресії генів *ZWF1* та *GND1* на

біосинтез рибофлавіну дріжджами *C. famata* (підрозділ 3.3.1). Вказані гени отримані з використанням геномної ДНК *C. famata* VKMY-9 як матриці. Надекспресували відповідний продукт окремо та разом на основі раніше сконструйованих штамів. Штами з надекспресією гена *GND1* продемонстрували збільшення продукції рибофлавіну.

У розділі також подано переконливі результати про зростання рівня продукції рибофлавіну у середовищі на основі молочної сироватки, аніж на YNB з 5% глюкози (підрозділ 3.3.2).

У дисертації вирішено також завдання дослідження пришвидшення потоку метаболітів у бік збільшення пулу попередника синтезу рибофлавіну (підрозділ 3.3.3). Відповідно, було одержано конструкт для введення у геном дріжджів *C. famata* L20105, AF-4, BRP гена *SOL3*. Перевірка фенотипу отриманих штамів показала, що лише трансформанти на основі AF-4 синтезували дещо більше рибофлавіну порівняно із батьківським штамом (а саме у 1,2 рази).

При дослідженні локалізації білка-екскретази Rfe1 у клітинах дріжджів *C. famata* (підрозділ 3.4.) дисертанту вдалося спростувати наявність його у ядерній мембрані, довести, що рибофлавін-екскретаза не містить ДНК-зв'язувальних доменів. Результати досліджень ілюстровані фото флуоресцентної мікроскопії клітин *C. famata* штаму L20105/RFE1-GFP у технологіях диференційного інтерференційного контрасту, флуоресцентної мікроскопії, фарбування DAPI та DAPI/GFP.

При аналізі теоретичного та експериментального матеріалу автор обґрунтовує вибрані підходи метаболічної інженерії та досвід попередніх дослідників з метою вирішення поставлених завдань – одержання штамів-надпродуцентів рибофлавіну з найбільш оптимальними характеристиками для використання у промисловості, а також встановлення можливості новостворених штамів продукувати ще більше рибофлавіну при зміні середовища, що могло б мати економічний ефект. У дисертації також окреслені плани подальших досліджень – детальніше дослідити вплив коекспресії генів *SOL3*, *ZWF1* та/або *GND1*, що є важливим для визначення перспективності роботи.

Дисертація завершується чотирма розлогами **висновками**, з яких третій висновок має ще підвисновки, в яких викладено головні наукові і практичні результати. Висновки відповідають завданням дисертаційного дослідження та свідчать про досягнення поставленої мети, мають наукову і практичну цінність. Найважливішим є те, що в роботі визначено закономірності дії чинників, залучених до регуляції біосинтезу рибофлавіну у дріжджів *C. famata*, що стало важливим підґрунтям

для опрацювання нових підходів у створенні продуцентів рибофлавіну з найбільш оптимальними характеристиками.

Список використаної наукової літератури налічує 193 джерела і включає праці «класичні» для галузі (найдавніше джерело – 1945 року) та праці останніх років (таких джерел 15).

Дискусійні положення та зауваження

Зауваження:

1. Назва ілюстрації Рис.3.18. не є коректною - «Зображення флуоресцентної мікроскопії клітин *C. famata*...». Переважно під назвою рисунка вказують конкретно об'єкт, зазначаючи збільшення або «Мікрофотографія ...».

2. Показники, подані у таблиці 3.1., 3.7. не містять критеріїв їхньої достовірної відмінності. Чи Ви їх не порівнюєте?

3. Можливо, доцільно було б розділити графік на Рисунку 3.9. Б ще на два графіки. На одному із них порівнювати синтез рибофлавіну вихідними штамами і штамами з найвищою продукцією. А на іншому – вихідними штамами і штамами з низьким рівнем продукції рибофлавіну.

Запитання:

1. Які сполуки, окрім рибофлавіну, можна одержувати за використання дріжджів *C. Famata* як продуцентів? Чи відомо щось про дослідження, проведені в цьому напрямку?

2. Якою мірою потрібно підвищити рівень синтезу рибофлавіну за використання отриманих Вами штамів аби вони були конкурентно здатними на промисловому рівні?

3. Чи є шляхи зниження кількості утворення токсичного 6-фосфоглюконолактону в клітинах штама BRP/ZWF1 для оптимізації умов одержання флавінів?

4. Чому, на Вашу думку, не вдалося отримати делеційні штами за геном *IMA1* на основі надпродуцентів AF-4 та BRP?

Загальний висновок

Отже, дисертаційна робота Андрєєвої Юлії Андріївни «Механізми дії нових регуляторних факторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» є

самостійним, завершеним науковим дослідженням. Актуальність обраної теми дослідження, достовірність та наукова новизна одержаних результатів, обґрунтованість наукових положень та висновків, їх вірогідність та повнота викладу в опублікованих працях свідчать про глибоку наукову самостійність авторки, сучасний рівень проведеного дослідження.

За структурою та змістом, актуальністю, новизною, практичним значенням, ступенем достовірності та обґрунтованості результатів та повнотою їхнього викладення у публікаціях, вищезазначена дисертація повністю відповідає вимогам наказу МОН України №40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а також вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 №44, а її автор, Андреева Юлія Андріївна, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент:

Зав. кафедри мікробіології

Львівського національного медичного університету

імені Данила Галицького

доктор медичних наук, професор

22.09.2022

О.П.Корнійчук

Підпис О.П.Корнійчук засвідчую:

Вчений секретар