

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Андрєвої Юлії Андріївни

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

Актуальність обраної теми

Рибофлавін (вітамін В₂), відіграє важливу роль у метаболізмі живих організмів. Насамперед, ця речовина є попередником коферментів флавопротеїнів – флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД). Рибофлавін не синтезується в клітинах тварин. Тому вітамін В₂ знаходить своє застосування у медицині, косметології, а також, як додаток до кормів у сільському господарстві, як барвник у харчовій промисловості. Ринок цього вітаміну становить близько 400 млн. американських доларів на рік, крім того, спостерігається тенденція до зростання цього показника у найближчі роки. Отже, рибофлавін займає важливе місце серед продуктів біотехнології.

На сьогодні комерційна продукція рибофлавіну базується на використанні штамів бактерій *Bacillus subtilis* та цвілевих грибів *Ashbya gossypii*. Раніше використовували також штам *der8* флавіногенних дріжджів *Candida famata*, але його застосування в промисловому виробництві припинили, в основному, через низьку стабільність продуцентів.

Шляхи біосинтезу рибофлавіну у мікроорганізмів та рослин відомі, однак, механізми регуляції цих процесів вивчені недостатньо. Таким чином, поглиблення знань про регуляцію флавіногенезу у мікроорганізмів, у тому числі у дріжджів, може допомогти в конструюванні поліпшених продуцентів та, в перспективі, в удосконаленні процесів промислового синтезу цього вітаміну.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше встановлено, що у дріжджів *C. famata* ген *VMAL*, що кодує вакуолярну АТФ-азу, відіграє роль негативного регулятора флавіногенезу.

З'ясовано, що промотори гена-активатора транскрипції *SEF1* із флавіногенних дріжджів сприяють покращеному синтезу рибофлавіну.

Вперше досліджено вплив посилення експресії генів *ZWF1*, *SOL3* та *GND1*, що кодують ферменти трьох реакцій окиснювального етапу пентозофосфатного шляху на синтез рибофлавіну дріжджами *C. famata*. Виявлено, що надекспресія гена *GND1*, що кодує 6-фосфоглюконатдегідрогеназу, підвищує рівень продукції рибофлавіну.

Вперше досліджено локалізацію білка-екскретази Rfe1 (RiboFlavinExcretase) у дріжджів *C. famata*. Завдяки використанню як репортера внутріклітинної локалізації зеленого

флуоресцентного білка (GFP) було з'ясовано, що цей білок розміщений у плазматичній мембрані.

Практичне значення отриманих результатів

Досліджені принципи регуляції синтезу рибофлавіну низкою факторів, що представлені в роботі, можуть бути використані надалі для конструювання нових стабільних надпродуцентів вітаміну В₂ шляхом комбінації модифікації експресії кількох регуляторних білків. Можливо, такі штами, за умови їхньої стабільності, були б здатні конкурувати із штамом *C. famata* der8, що колись використовували у промисловості. Потенційно це дасть можливість впровадити відповідні штами в промислове виробництво на біотехнологічних підприємствах.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Результати, висвітлені у роботі, базуються на власних дослідженнях дисертантки, з використанням сучасного підходу біотехнології - метаболічної інженерії. У роботі наведено чотири висновки, що відповідають отриманим результатам.

Особистий внесок здобувача

Робота містить положення і висновки, сформульовані дисертанткою особисто. План проведення досліджень для виконання завдань було визначено із допомогою наукового керівника, д.б.н., проф., акад. Сибірського А.А. Спільно із науковим керівником дисертантка аналізувала результати експериментальних досліджень. Здобувачка, іноді з допомогою наукового керівника, займалася пошуковою роботою для підбору найкращого методу чи методики, аби досягнути поставленої мети експерименту. Підготовка наукових публікацій проводилася аспіранткою за консультативної підтримки наукового керівника. Представлені у дисертації результати досягнуто проведенням аспіранткою наукових досліджень у співпраці зі співавторами публікацій. Аналіз отриманих аспіранткою результатів здійснювалася спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дослідження

Основні наукові результати дисертаційної роботи висвітлено в 10-ти наукових працях, з них: три статті у фахових наукових виданнях, у т.ч. дві – у закордонних виданнях з Q2-4; у семи тезах доповідей на міжнародних наукових конференціях в Україні і за кордоном.

Оцінка змісту і структури дисертації

Дисертаційна робота Андреевої Ю. А. оформлена згідно до останніх вимог, передбачених Наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року № 40 зі змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства освіти і науки № 759 від 31 травня 2019 року.

Структура та обсяг роботи:

Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел.

Роботу викладено на 132 сторінках друкованого тексту, вона містить 19 рисунків та 8 таблиць. Список використаної літератури налічує 191 джерело. У кінці роботи долучено 3 додатки.

Окремі зауваження і дискусійні запитання

Зауваження

Використання умовних позначень в тексті дисертації не впорядковане; після умовного позначення знову може бути повна назва і навпаки. Деяких умовних позначень, які є в тексті, немає в переліку.

Розділ 2.5 доцільно назвати **Поживні середовища, умови культивування мікроорганізмів**

У Розділі 2.6.2. не вказані умови визначення активності ферментів (температура, час інкубації. Як розраховували активність ферментів? В яких одиницях виражали активність?

Розділ 2.8. доцільно назвати **Визначення концентрації рибофлавіну**

В тексті дисертації написано, що нагромадження біомаси штамом *vtalΔ* зменшилось в 2,8 раза порівняно зі штамом L20105, а згідно результатів поданих в таблиці 3.1 в 1,4 раза. Які результати коректні?

На Рис. 3.2.Б і 3.6.Б не вказано розміри маркерів ДНК на фотографіях гелів після електрофоретичного розділення фрагментів ДНК

В списку використаних джерел є чотири статті українською мовою, розміщених після публікацій латинським шрифтом. Згідно вимог першими у списку повинні бути публікації кириличним шрифтом.

Деякі статті, які опубліковані в журналах Биохимия, Микробиология, Генетика, російською мовою в списку подані як англomовні

Запитання

Ефект делеції гена *IMA1* вакуолярної АТФ-ази у дріжджів *Pichia guilliermondii* виявлений більше 10 років тому. Чи вдалося з'ясувати причини і механізм негативної регуляції геном *IMA1* біосинтезу рибофлавіну?

Вами показано, що промотори гена-активатора транскрипції SEF1 із флавіногенних дріжджів відновлюють здатність до надсинтезу рибофлавіну штамом *sef1Δ* на відміну від промоторів цього гена з нефлавіногенних дріжджів. Які можуть бути причини цього феномену? Чи аналізували послідовності промоторів?

Загальний висновок

Вважаю, що дисертаційна робота Андреевої Ю. А. «Механізми дії нових регуляторних факторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» за актуальністю досліджуваної проблеми, високим методичним рівнем виконання, науковою новизною та практичним значенням отриманих результатів заслуговує на високу оцінку і може бути представлена до розгляду в спеціалізовану вчену раду по захистах дисертацій за спеціальністю 091 – Біологія на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Рецензент

к.б.н., доц.,

н.сп. відділу аналітичної біотехнології

Інституту біології клітини НАН України

Андрій ЗАКАЛЬСЬКИЙ

27 липня 2022 р.