

## ВІДГУК

офіційного опонента д.мед.н. проф. Корнійчук Олени Петрівни на дисертаційну роботу Цирульника Андрія Олександровича «НОВІ ЧИННИКИ, ЗАЛУЧЕНІ В РЕГУЛЯЦІЮ СИНТЕЗУ ФЛАВІНІВ У ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA*» представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – Мікробіологія.

**Актуальність теми дисертації.** Використання біологічно активних добавок дає змогу підвищити харчову цінність продуктів, запобігти метаболічним порушенням та виникненню цілої низки захворювань. Вітаміни групи В, особливо рибофлавін ( $B_2$ ), є важливими факторами попередження виникнення захворювань нервової системи, органів зору, шкірних покривів та ін. Рибофлавін широко використовують у комплексному лікуванні малярії, порушень імунної відповіді, запальних процесів, сепсису, діабету, дерматитів, глоситів, стоматитів. Виявлено захисну дію цього вітаміну для організму при лікуванні онкологічних захворювань із використанням хіміотерапевтичних препаратів. Нестача рибофлавіну спричиняє порушення розвитку плода, головно нервової системи. Основна частина отриманого біотехнологічним способом рибофлавіну застосовується для підвищення харчової цінності кормів у тваринництві. Підвищення вмісту цього вітаміну у кормах дозволяє суттєво збільшити надій молока у корів, знизити рівень падежу молодняка худоби, підвищити яйценосність курей. Це покращує ефективність та прибутковість ведення фермерських господарств.

Пошук та виробництво нових антибіотичних сполук є важливим напрямком сучасної медицини. Відомо, що бактерії *Streptomyces davaonensis* та *S. cinnabarinus* синтезують флавіновий антибіотик розеофлавін та його метаболічний попередник амінорибофлавін. Для цих сполук встановлено антибіотичну активність проти низки бактерій, зокрема, збудників небезпечних інфекційних захворювань, серед яких *Staphylococcus aureus*,

*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, а також *Plasmodium falciparum* та ін.

Основною цінністю цих флавінових антибіотиків є їхня цитостатична дія на метицилін-резистентні мутантні штами золотистого стафілокока MRSA. Інфекції, викликані штамами MRSA, відносять до одних із найнебезпечніших із високим рівнем летальності.

Конструювання мікроорганізмів із застосуванням методів генної інженерії, здатних до надсинтезу згаданих вище флавінових сполук, є актуальним завданням сучасної мікробіології, біотехнології та медицини.

### **Наукова новизна отриманих результатів.**

Встановлено, що введення гена екскретази у дріжджові клітини приводить до збільшення продукції цього вітаміну в 1,5 раза. Виявлено збільшення рівня продукції рибофлавіну дріжджами *Candida famata* внаслідок збільшення активності його екскреції. Також показано, що активація системи транспорту рибофлавіну в дріжджових клітинах викликає підвищення активності ферменту 1-го етапу синтезу цього вітаміну – ГТФ-циклогідролази II та відповідного гена *RIB1*.

Введення додаткової копії гена *SEF1* (кодує транскрипційний фактор Sef1) під контролем лактозо-індукованого промотра *LAC4* також підвищує продукцію рибофлавіну на 30% у лактозовмісних середовищах.

Доведено ефективність використання дешевого побічного продукту молочної промисловості – молочної сироватки як потенційного культурального середовища для синтезу рибофлавіну дріжджами.

Вперше сконструйовано дріжджовий надсинтетик бактерійної антибіотичної сполуки – амінорибофлавіну. Оскільки дріжджі є еукаріотичними мікроорганізмами, можливість їх використання для продукції корисних сполук прокаріотичних мікроорганізмів відкриває

широкі перспективи для розвитку сучасної мікробіології та біотехнології у цьому напрямку.

### **Практичне значення результатів досліджень.**

Сконструйовано покращені дріжджові продуценти рибофлавіну. На спосіб отримання продуцента РФ шляхом посилення екскреції цього вітаміну отримано патент України на винахід та патент України на корисну модель. Введення гена екскретази під контролем сильного конститутивного промотора *TEF1* та викликане підвищення рівня продукції рибофлавіну може бути використане як ефективний підхід у конструюванні мікробних продуцентів інших цільових продуктів.

Введення гена, що кодує регуляторний фактор *Sef1* під контролем лактозо-індукційного промотора *LAC4* забезпечило високий рівень продукції рибофлавіну на лактозовмісних середовищах, зокрема, молочній сироватці. Оскільки молочна сироватка є побічним дешевим продуктом виробництва сирів – цей підхід дозволить суттєво здешевити мікробний синтез цього вітаміну у промисловому виробництві. Використання індукованих субстрат-специфічних промоторів відкриває нові можливості для конструювання мікробних надсинтетиків низки корисних сполук із використанням інших видів дешевих відходів промисловості як культуральних середовищ.

Вперше, сконструйовано продуцент бактерійної антибіотичної сполуки на основі еукаріотичних мікроорганізмів – дріжджів. Використаний підхід може слугувати як модель для створення мікробних продуцентів інших біологічно-активних сполук далеких між собою у філогенетичному сенсі. Подальше покращення створеного дріжджового продуцента амінорибофлавіну дозволить отримати високий рівень синтезу цієї корисної сполуки. На спосіб одержання амінорибофлавіну отримано патент України на корисну модель.

**Особистий внесок здобувача.** Висвітлені в роботі результати отримані дисертантом самостійно. Планування роботи, аналіз результатів досліджень проводилися спільно з науковим керівником. Співучасть у роботі колег висвітлена у спільних публікаціях. Здобувач представив результати дисертаційної роботи також у формі усних та стендових доповідей на низці міжнародних конференцій.

**Достовірність та обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації,** підтверджено значою кількістю опрацьованих джерел літератури, проведенням широкого спектру експериментальних досліджень із використанням різних підходів та ґрунтовним аналізом одержаних даних. Робота проведена із використанням сучасних методів, технологій, приладів та реактивів.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.** Результати роботи опубліковані у вигляді 5 статей у професійних фахових наукових виданнях - 3 з яких у міжнародних (Scopus) та 2 у українських журналах. Сумарний рейтинговий імпакт-фактор (IF) публікацій за темою дисертації становить 9,4. Результати досліджень також були представлені на 10 наукових конференціях. Як зазначено вище, за результатами роботи отримано 1 патент України на винахід та 2 патенти України на корисну модель, що є додатковим свідченням достовірності та цінності проведеної дисертаційної роботи.

Автореферат відображає основні положення проведеної роботи.

Дисертаційна робота складається із анотації українською та англійською мовами, вступу, списку публікацій, переліку умовних позначень, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатку1 . Загальний обсяг дисертації складає 176 сторінок. Перелік опублікованих праць за темою дисертації налічує 18

найменувань. Дисертація містить 36 рисунків та 12 таблиць. Список використаної літератури налічує 203 джерела. Додаток 1 включає список опублікованих праць за темою дисертації.

За обсягом та структурою дисертація Цирульника А. О. відповідає вимогам ВАК України та спеціальності: 03.00.07 – Мікробіологія.

### **Зауваження та побажання щодо дисертації:**

1. Рівень синтезу амінорибофлавіну сконструйованими дріжджовими продуцентами досить низький. Тому, на даному етапі роботи передчасно говорити про перспективність використання цих надсинтетиків для отримання амінорибофлавіну в препаративних кількостях, тим більше у промисловому мікробному виробництві.
2. При обговоренні результатів щодо амінорибофлавіну, доцільно було б запропонувати можливі шляхи підвищення рівня синтезу цього флавіну на базі створених дріжджових продуцентів.
3. Важливо навести дані, щодо створення надсинтетиків амінорибофлавіну та розеофлавіну із застосуванням природних нативних продуцентів цих сполук, бактерій роду *Streptomyces*. Як відомо, дослідження у цьому напрямку проводяться в інших наукових лабораторіях, зокрема в Німеччині.
4. Для ґрунтовного аналізу антибіотичної дії отриманого амінорибофлавіну, в майбутньому необхідно провести низку досліджень у рамках співпраці із профільними медичними установами, які спеціалізуються на роботі із патогенними мікроорганізмами.
5. Не згадується, наскільки дріжджі проявляють стійкість до дії амінорибофлавіну, і чи не буде це обмежувальним фактором при спробах посилення продукції цієї антибіотичної сполуки у цьому виді мікроорганізмів.
6. Чи існують припущення, чому дріжджі не здатні до росту у концентрованій молочній сироватці?

Формальні зауваження до дисертаційної роботи: у тексті дисертації зустрічаються неточності та друкарські помилки. В роботі присутні іншомовні фрази і терміни. Здобувачу слід дотримуватися загальноприйнятої системи позначень, скорочень та термінів.

Зазначені недоліки не знижують загальної високої позитивної оцінки дисертаційної роботи.

**Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці.** Опрацьовані дисертантом підходи генної інженерії для отримання продукції корисних сполук із використанням дріжджів, а також сконструйовані штами та плазміди можуть бути використані у науково-педагогічних закладах, зокрема для навчання студентів за спеціальностями – мікробіологія, біотехнологія, генетика та медична мікробіологія.

За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертації не було виявлено ознак академічного plagiatu, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації.

**Висновок про відповідність дисертації вимогам атестаційної комісії Міністерства освіти і науки України:**

1. Дисертаційна робота Цирульника Андрія Олександровича «НОВІ ЧИННИКИ, ЗАЛУЧЕНІ В РЕГУЛЯЦІЮ СИНТЕЗУ ФЛАВІНІВ У ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA*» є завершеною науковою роботою, в якій пропонуються нові підходи для створення надпродукентів корисних флавінових сполук, зокрема, вітаміну  $B_2$  та антибіотичної сполуки амінорибофлавіну.
2. Автореферат відображає зміст та основні положення дисертації, а сама дисертація містить значну кількість експериментальних даних представлених у вигляді рисунків та таблиць.
3. Результати дисертаційної роботи в повному обсязі висвітлені та опубліковані в 5 фахових наукових виданнях, 3 з яких у міжнародних

журналах (Scopus). Також отримано 1 патент України на винахід та 2 патенти на корисну модель. Результати апробовані на 10 наукових конференціях.

4. Висловлені зауваження не зменшують наукового значення поданої до захисту роботи.

Дисертаційна робота Цирульника Андрія Олександровича відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів», відображає зміст Постанови Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. № 1197 "Деякі питання присудження (позбавлення) наукових ступенів", наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації" і наказу Міністерства освіти і науки України від 23.09.2019 № 1220 «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук», а автор роботи заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

доктор медичних наук, професор,

завідувач кафедри мікробіології

Львівського національного медичного університету

імені Данила Галицького

**Корнійчук О.П.**

Підпис Корнійчук О.П. захищено

Вчений секретар

