

## ВІДГУК

офіційного опонента, академіка НАН України, д.б.н. проф. Підгорського Валентина Степановича на дисертаційну роботу Цирульника Андрія Олександровича «Нові чинники, залучені в регуляцію синтезу флавінів у дріжджів *Candida famata*», представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

### **Актуальність теми дисертаційної роботи.**

Конструювання генетично модифікованих мікроорганізмів, здатних до надпродукції корисних біологічно активних сполук, є перспективним напрямком сучасної мікробіології. На сьогодні налагоджено мікробне виробництво вітамінів, антибіотиків та інших сполук. Рибофлавін відносять до універсального медіатора багатьох біологічних процесів, що дозволяє використовувати його в різних галузях, зокрема, медицині, тваринництві та харчовій промисловості. Додаткове внесення цього вітаміну в раціон людини дозволяє попередити виникнення низки метаболічних розладів. Рибофлавін застосовують при лікуванні катаракти, малярії, діабету, інфекційних та імунних захворювань, нервових розладів, дерматитів, глоситів, стоматитів. Існують докази позитивного терапевтичного ефекту рибофлавіну при хіміотерапії онкологічних захворювань. Проте основну частину отриманого рибофлавіну застосовують для підвищення харчової цінності кормів у галузі тваринництва.

Промислове виробництво рибофлавіну проводять із застосуванням генетично модифікованих штамів бактерій *Bacillus subtilis* та міцеліальних грибів *Ashbya gossypii*. Використання дріжджового штаму dep8 *Candida famata* було зупинено через його генетичну нестабільність. Конструювання нових стабільних штамів цього виду дріжджів здатних до надсинтезу рибофлавіну є перспективним напрямком досліджень, оскільки дріжджі стійкі до лізису, спричиненого бактеріофагами та здатні рости на простих

культуральних середовищах. Крім цього, дріжджова біомаса є цінною харчовою добавкою.

Іншим важливим напрямком використання генетично модифікованих мікроорганізмів є налагодження промислового виробництва антибіотиків. На даний час мікробним синтезом отримують цілу низку антибіотиків. Відомо, що бактерії роду *Streptomyces* синтезують розеофлавін та його метаболічний попередник амінорибофлавін. Обидві сполуки виявляють антибактеріальну дію проти збудників важких інфекційних захворювань – золотистого стафілокока, його метицилін-резистентних штамів MRSA та інших патогенів. Конструювання рекомбінантних штамів мікроорганізмів, здатних до надсинтезу флавінових антибіотиків, відкриває нові перспективи лікування згаданих вище захворювань. На сьогодні, розеофлавін та амінорибофлавін синтезують лише хімічним шляхом у невеликих кількостях.

### **Наукова новизна результатів дисертаційної роботи.**

Вперше показано зростання рівня продукції рибофлавіну як результат активації системи транспорту цього вітаміну у дріжджів *Candida famata*. Крім цього, надекспресія гена рибофлавін-екскретази *RFE1* привела до підвищення активності ферменту ГТФ-циклогідролази, який катализує перший етап синтезу рибофлавіну та збільшення рівня експресії гена *RIB1*.

Введення гена регуляторного фактора *Sef1* під контролем лактозо-індуциального промотора *LAC4* дозволило збільшити рівень продукції рибофлавіну у лактозовмісних середовищах. Підтверджено здатність до активного росту та продукції рибофлавіну сконструйованими дріжджовими штамами за умови вирощування в молочній сироватці як перспективному та дешевому культуральному середовищі. Можливість використання дешевих відходів різних галузей промисловості дозволить налагодити нові способи промислового виробництва рибофлавіну.

Вперше отримано продукцію флавінової антибіотичної сполуки амінорибофлавіну в дріжджах *Candida famata*. Це перша успішна спроба отримати синтез цінної сполуки прокаріотичного бактерійного походження в еукаріотичних дріжджах. Сконструйовані дріжджові продуценти амінорибофлавіну можуть бути використані як база для подальшого підвищення рівня мікробного синтезу цієї сполуки та, у перспективі, налагодження її промислового виробництва.

### **Практичне значення результатів дисертаційної роботи.**

Використаний підхід активації екскреції рибофлавіну з метою підвищення його продукції може бути використаний для покращення існуючих мікробних продуцентів цього вітаміну та інших біологічно активних сполук. На основі цих результатів отримано патент України на винахід та патент України на корисну модель.

Надекпресія гена *SEFI* під контролем лактозо-індуцибельного промотора *LAC4* забезпечило підвищення рівня продукції рибофлавіну дріжджовими клітинами за умови культивування в молочній сироватці. Цей підхід дозволяє налагодити мікробний синтез цінних біологічно активних сполук із використанням дешевих відходів харчової промисловості, що суттєво підвищить рентабельність цих виробництв, одночасно забезпечуючи утилізацію використаних відходів та захист довкілля.

Інфекційні захворювання спричинені золотистим стафілококом, особливо його метицилін-резистентними штамами MRSA, відносять до одних із найпоширеніших та небезпечних із високим рівнем смертності. Пошук та виробництво нових антибіотиків проти цих збудників є ще одним важливим напрямком сучасної мікробіології. Отриманий дріжджовий штам, здатний до синтезу амінорибофлавіну, відкриває нові перспективи для вирішення проблеми лікування інфекційних захворювань. На спосіб

конструювання дріжджового продуцента амінорибофлавіну отримано патент України на корисну модель.

### **Особистий внесок здобувача.**

Здобувачем проведено експериментальні дослідження. Разом із науковим керівником проаналізовано отримані результати. Результати дисертаційної роботи опубліковані у співавторстві з співробітниками відділу та закордонними партнерами. У більшості опублікованих статей та патентів дисертант є першим автором.

### **Ступінь обґрутованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертаційній роботі.**

Планування та проведення дисертаційної роботи базується на аналізі великої кількості літературних джерел за темою дисертації. У роботі використані сучасні методи генної інженерії та молекулярної біології. Експерименти проводились із використанням якісних реагентів європейських фірм на сучасному високоточному сертифікованому обладнані від провідних виробників. Результати роботи опубліковані у низці закордонних фахових видавництв, що гарантують високий рівень рецензування опублікованих праць.

### **Повнота викладу матеріалів дисертаційної роботи.**

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей у фахових наукових виданнях - 3 праці у міжнародних виданнях (Scopus) та 2 в українських журналах. Імпакт-фактор (IF) публікацій - 9,4. Експериментальні дані представлені на 10 наукових міжнародних та українських конференціях. Крім цього, результати роботи запатентовані. Отримано 1 патент України на винахід та 2 патенти України на корисну модель.

Автореферат повною мірою висвітлює ключові положення дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота містить наступні розділи: анотації українською та англійською мовами, вступ, список публікацій, перелік умовних позначень, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, аналіз та узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел та додаток 1. Дисертаційна праця налічує 176 сторінок. Перелік публікацій складає 18 найменувань. Дисертація добре проілюстрована у вигляді 36 рисунків та 12 таблиць. За темою дисертації опрацьовано 203 джерела літератури. У Додатку 1 представлено перелік публікацій за темою дисертаційної роботи.

### **Зauważення та побажання щодо дисертаційної роботи:**

1. У роботі представлено результати конструювання дріжджових штамів із надекспресією гена екскретази рибофлавіну *RFE1* та регуляторного гена *SEF1*. Як реципієнтні штами використано рекомбінанти із надекспресією генів синтезу пуринів *de novo PRS3* та *ADE4*. Створені трансформанти виявляють суттєве збільшення продукції рибофлавіну у кожному окремому випадку. Проте усі досягнуті рівні надсинтезу рибофлавіну не дають зможи використати згадані рекомбінантні штами дріжджів для налагодження промислового виробництва цього вітаміну.

Для створення конкурентного промислового продуцента рибофлавіну на основі дріжджів *C. famata* є доцільним комплексне поєднання застосованих підходів для досягнення надекспресії усіх використаних генів в одному рекомбінантному штамі, що дозволить підвищити рівень продукції рибофлавіну.

2. Використання молочної сироватки як культурального середовища дозволить суттєво здешевити процес мікробного виробництва рибофлавіну. Як можна пояснити відсутність росту дріжджових клітин на концентрованій сироватці та чи є припущення щодо можливих шляхів вирішення цієї проблеми?

3. Чи були спроби дослідити здатність дріжджів до росту та синтезу рибофлавіну за використання інших культуральних середовищ на основі відходів різних галузей промисловості - бегаси, меляси та пивного сусла. Чи існують припущення чому дріжджі нездатні рости на технічному гліцеролі та як цю проблему можна вирішити ?

4. Для більш ґрунтовного аналізу перспективності використання сконструйованих дріжджових надсинтетиків рибофлавіну в промисловості важливо проводити попередні випробування із використанням біореакторів та у співпраці із профільними біотехнологічними виробництвами.

5. Бактерій роду *Streptomyces* здатні продукувати низку антибіотичних та інших корисних сполук. Ці мікроорганізми широко використовують у сучасній генній інженерії та промисловій мікробіології. Чому для конструювання продуцента амінорибофлавіну було використано саме дріжджі а не їх природний продуцент - бактерій *Streptomyces davaonensis* ?

Наведені зауваження та побажання не знижують цінності та важливості рецензованої дисертаційної роботи, яка заслуговує високої оцінки.

#### **Рекомендації щодо використання результатів дисертаційної роботи в практиці.**

Сконструйовані рекомбінантні штами можуть бути використані для налагодження технології отримання рибофлавіну з використанням дешевої молочної сироватки. Опрацьовані у роботі підходи до створення надсинтетиків рибофлавіну та амінорибофлавіну є корисними для створення дріжджових продуцентів інших біологічно активних сполук. Методичні підходи та отримані результати можуть бути використані для підготовки

студентів за профільними спеціальностями мікробіологія та біотехнологія вищих навчальних установ.

## Висновок про відповідність дисертаційної роботи вимогам атестаційної комісії Міністерства освіти і науки України.

Матеріали дисертаційної роботи опубліковані у 5 фахових наукових виданнях та представлені на 10 міжнародних та українських конференціях. Розроблені та використані у роботі методичні підходи представлені у вигляді 3 патентів.

Обсяг, структура та рівень виконання дисертаційної роботи Цирульника Андрія Олександровича за темою «Нові чинники, залучені в регуляцію синтезу флавінів у дріжджів *Candida famata*», відповідає вимогам "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань" Міністерства освіти і науки України».

Дисертація заслуговує високої оцінки, а автор присудження ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Доктор біологічних наук, професор, академік НАН України  
радник при дирекції

## Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України

Родионов

Підгорський В.С.

