

Рішення
разової спеціалізованої вченої ради
про присудження ступеня доктора філософії

Здобувач ступеня доктора філософії Вен Лю,
1993 року народження, громадянин Китайської Народної Республіки,
освіта вища: закінчив у 2019 році Чжецзянський Океанський Університет
за спеціальністю наука про море,
навчається в аспірантурі в Інституті біології клітини Національної академії наук України, м. Львів,
виконав акредитовану освітньо-наукову програму «Освітньо наукову програму» Інституту біології клітини НАН України.

Разова спеціалізована вчена рада, утворена наказом Інституту біології клітини Національної академії наук України, м. Львів від «28» лютого 2025 року № 14/ОД, у складі:
Голови разової спеціалізованої вченої ради – Наталія Стасюк, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології, заступник директора з наукової роботи, Інститут біології клітини НАН України

Рецензентів - Ольга Демків, кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України

Андрій Закальський, кандидат біологічних наук, доцент, науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України
(власне ім'я, прізвище, науковий ступінь, вчене звання, посада, місце роботи)
Офіційних опонентів - Богдан Остап, доктор біологічних наук, професор, головний науковий співробітник кафедри генетики та біотехнології, професор кафедри генетики та біотехнології, Львівський національний університет імені Івана Франка

Сергій Шульга, доктор біологічних наук, професор, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії промислової та харчової біотехнології відділу геноміки і молекулярної біотехнології, заступник директора з наукової роботи ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

на засіданні «24» квітня 2025 року прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – біологія Вену Лю
на підставі публічного захисту дисертації «Нові дані щодо ролі GND1, RIB6, RFE1 та деяких інших генів у надсинтезі рибофлавіну дріжджами Candida famata»
за спеціальністю 091 – біологія.

Дисертацію виконано в Інституті біології клітини Національної академії наук України, м. Львів.

Науковий керівник Андрій Сибірний, доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, Інститут біології клітини Національної академії наук України, директор.

Дисертацію подано у вигляді спеціально підготовленого рукопису англійською мовою, який повністю відповідає вимогам до оформлення дисертації, затвердженим Наказом МОН України від 12.01.2017 р., № 40.

У дисертаційній роботі вперше показано, що одночасна надекспресія генів *GND1*, *RIB6* (що кодує 3,4-дигідрокси-2-бутанон 4-фосфат-синтазу, відповідальну за конверсію Ru5P), та

RFE1 (що кодує білок, залучений у експорт рибофлавіну) забезпечує 3,3-кратне підвищення продуктивності рибофлавіну у штамі *Candida famata* VKM Y-9.

Досліджено роль рибулозо-5-фосфату (Ru5P), одного з ключових попередників біосинтезу рибофлавіну, у дріжджах *C. famata*. На основі аналізу оксидативної гілки пентозофосфатного шляху встановлено, що надекспресія гена *GND1* сприяє підвищенню рівня біосинтезу рибофлавіну, тоді як надекспресія *ZWF1* негативно впливає на продукцію вітаміну та ріст клітин.

Окрім факторів безпосередньо біосинтетичного шляху, досліджено механізми регуляції рибофлавінового метаболізму. Встановлено, що експресія гена *SEF1* (що кодує транскрипційний фактор Sef1) виключно під контролем промоторів флавіногенних дріжджів сприяє підвищенню продукції рибофлавіну. Також доведено, що ген *VMA1* (що кодує α -субодиницю вакуолярної АТФази) відіграє роль негативного регулятора біосинтезу рибофлавіну у *C. famata*.

Отримані результати значно розширюють знання про механізми регуляції біосинтезу рибофлавіну та відкривають нові підходи до створення високопродуктивних промислових штамів *C. famata*.

Виявлені гени та фактори біосинтезу рибофлавіну можуть бути використані для створення нових високоефективних продуцентів на основі удосконаленого штаму BRPI за допомогою комбінування та модифікації їхньої експресії. Отримані штами характеризуються стабільністю та конкурентоспроможністю як надпродуценти рибофлавіну, що відкриває можливість їхнього впровадження у промислове виробництво.

Отримані результати можуть слугувати теоретичною основою для підготовки фахівців у галузі мікробних біотехнологій, та практичною основою для подальшої оптимізації продуцентів рибофлавіну.

Здобувач має 11 наукових публікацій за темою дисертації, з них 4 статті у наукових фахових виданнях, що входять до WoS або Scopus, 7 тез доповідей в збірниках матеріалів конференцій:

Статті у виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core або Scopus:

1. **Liu, W.**, Tsyrlunyk, A., Dmytruk, K., Fedorovych, D., Kang, Y., and Sibirny, A. (2025). Co-overexpression of genes *RFE1*, *GND1*, and *RIB6* enhances riboflavin production in yeast *Candida famata*. *Cytology and Genetics*, 59(1), 63–70. <https://doi.org/10.3103/S0095452725010074>. Q4, Scopus and WoS. (Автор разом зі співавторами провів дослідження, проаналізував та узагальнив отримані дані, взяв участь у написанні та оформленні публікації).
2. Ruchala, J., Andreieva, Y., Tsyrlunyk, A., Sobchuk, S., Najdecka, A., **Liu, W.**, Kang, Y., Dmytruk, O., Dmytruk, K., Fedorovych, D., and Sibirny, A (2022). Cheese whey supports high riboflavin synthesis by the engineered strains of the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 161–169. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01888-0>. Q1, Scopus and WoS. (Автор разом зі співавторами провів дослідження, проаналізував та узагальнив отримані дані, взяв участь у написанні та оформленні публікації).
3. Andreieva, Y., Petrovska, Y., Lyzak, O., **Liu, W.**, Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020). Role of the regulatory genes *SEF1*, *VMA1* and *SFU1* in riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*, 37(9–10), 497–504. <https://doi.org/10.1002/yea.3503>. Q2, Scopus and WoS. (Автор разом зі співавторами провів дослідження, проаналізував і узагальнив отримані дані, а також взяв участь у написанні та оформленні публікації).
4. Andreieva, Y., Lyzak, O., **Liu, W.**, Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A. (2020). *SEF1* and *VMA1* genes regulate riboflavin biosynthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Cytology and Genetics*, 54(5), 379–385. <https://doi.org/10.3103/s0095452720050023>. Q4, Scopus and WoS. (Автор разом зі співавторами провів дослідження, проаналізував і узагальнив отримані дані, а також взяв участь у написанні та оформленні публікації).

У дискусії взяли участь (голова, рецензенти, офіційні опоненти, інші присутні) та висловили зауваження:

Рецензент – Андрій Закальський, кандидат біологічних наук, доцент, науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України, *надав позитивну рецензію із зауваженнями та питаннями:*

Дискусійні питання та зауваження.

Оцінюючи роботу позитивно, було б доречним висловити певні зауваження та побажання, усунення яких додадо б більшого розуміння суті проведеного дослідження:

1. Ефект делеції гена *VMA1* вакуолярної АТФ-ази у дріжджів *Pichia guilliermondii* було виявлено більше 10 років тому. Чи вдалося з'ясувати причини та механізм негативної регуляції біосинтезу рибофлавіну геном *VMA1*?

2. 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?

3. Чи існують спільні риси між промоторами гена *SEF1* у флавіногенних дріжджів та інших видів?

Рецензент – Ольга Демків, кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України, *надала позитивну рецензію із зауваженнями та запитаннями:*

Розділі 4. ОБГОВОРЕННЯ. Сторінка 127. Ви зазначаєте значне зростання експресії *ZWF1* та активності *G6PDH* у рекомбінантних штамів *S. famata* (L2/*ZWF1*, AF-4/*ZWF1*, BRP/*ZWF1*) порівняно з вихідними, що супроводжувалося зменшенням продукції рибофлавіну та біомаси. Ви припускаєте, що причиною цього може бути збільшене утворення НАДФН у

S. famata, що призвело до порушення метаболічного гомеостазу, спричинивши зворотне інгібування ключових ферментів, обмежуючи таким чином синтез рибофлавіну.

- Чи проводився аналіз рівнів коферментів, зокрема НАДФН, у трансформантах, що характеризуються надекспресією гена *ZWF1* або *GND1*? Отримання таких даних є важливим і могло б надати цінну інформацію для глибшого розуміння отриманих результатів.

- Чи досліджували зміни рівнів інших метаболітів у пентозофосфатному шляху, а також активності ключових ферментів, залучених до біосинтезу рибофлавіну, за умов надекспресії генів *ZWF1* та *GND1*?

Розділ 3.1.2 присвячено дослідженню надекспресії генів *RFE1*, *GND1* та *RIB6*, що призводить до 3,3-кратного збільшення виробництва рибофлавіну на середовищі із молочною сироваткою порівняно з вихідним штамом VKM Y-9 *S. famata* та інгібування росту.

- Поясніть потенційні механізми, що лежать в основі виявленого 25% зниження накопичення біомаси сконструйованих штамів на середовищі із молочною сироваткою порівняно з вихідним штамом VKM Y-9?

- Чи описані в літературі подібні ефекти зниження біомаси при надсинтезі рибофлавіну?

- Чи дозволяє розроблена в дослідженні надекспресія генів *RFE1*, *GND1* та *RIB6* досягти або перевищити показники промислових штамів, описаних в літературі, зокрема штаму *Ashbya gossypii*?

Офіційний опонент - Богдан Остап, доктор біологічних наук, професор, головний науковий співробітник кафедри генетики та біотехнології, професор кафедри генетики та біотехнології, Львівський національний університет імені Івана Франка, *надав позитивний відгук із зауваженнями:*

Зауваження щодо дисертації:

1. Текст дисертації містить низку граматично некоректних зворотів – напр. “The constructed cassette was have been.....”, стор. 109. Інколи речення не містять дієслова.

2. В методах і в результатах дисертації немає згадки про верифікацію плазмід експресії генів методами секвенування ДНК. Наскільки здобувач впевнений, що використані конструкції не містять

сторонніх генетичних перебудов чи помилок ПЛР, які впливатимуть на отримані результати?

3. Неочікуваний негативний вплив експресії *ZWF1* на продукцію рибофлавіну автор тлумачить в Обговоренні як наслідок наразі невідомих регуляторних впливів цього гена, або ж змін у пулі NADPH. Чи є спосіб перевірити останню гіпотезу, напр. при вирощуванні за наявності екзогенно доданого NADPH?

4. Дослідження промоторів генів з ортологічної групи *SEF1*, стор. 108-111. Вивчення цього гена посідає важливе місце в дисертації, і повнішого розуміння результатів можна було б досягти при докладнішому описі – що відомо і що власне зроблено. Доречною в огляді літератури була б інформація про операторну послідовність цього транскрипційного фактора (чи згадка про відсутність таких даних); в результатах – множинне вирівнювання досліджуваних промоторів генів; розміри клонованих промоторів і дані про авторегуляторні властивості *Sef1*. Ці доповнення виглядали б органічно як частина рис. 3.25.

Ці зауваження не впливають на висновки роботи та не знижують її практичного значення й високої оцінки.

Офіційний опонент - Сергій Шульга, доктор біологічних наук, професор, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії промислової та харчової біотехнології відділу геноміки і молекулярної біотехнології, заступник директора з наукової роботи ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», *надав позитивний відгук із зауваженнями та побажаннями:*

Зауваження та побажання.

1. У випадку надекспресії одних генів може відбуватись інгібування / пригнічення інших генів чи зміна метаболічних шляхів. Чи звертали на це увагу і чи було це досліджено?
2. В дисертації зазначено, що «досліджено гени і фактори регуляції біосинтезу рибофлавіну», однак, не наголошено які саме фактори було досліджено.
3. Третє завдання дисертації стосувалось дослідження властивостей промоторів як флавіногенних, так і не флавіногенних дріждів. Однак у висновках зазначено тільки перші.
4. Хоча в роботі обговорюється вплив низки генів на екскрецію вітаміну в середовище, але не обговорюється який саме механізм цього процесу.
5. В дисертації не наведено результати дослідження стабільності отриманого продуценту. Якщо продуцент стабільний, то яка кількість пересівів можлива?
6. Здобувачем доцільно було б навести конкретні «виходи» (накопичення) рибофлавіну отриманим штамом-продуцентом на різних середовищах і порівняти з отриманими раніше.
7. Молочна сироватка, яку використовували як ростове середовище, це продукт, що має відносно низьку поживну цінність. Чому саме сироватку було обрано як середовище для культивування?

Однак, зазначені зауваження не суттєво впливають на загальне позитивне враження від роботи та мають в тому числі дискусійний характер. Загалом дисертаційна робота написана на достатньо високому науковому рівні.

Голова разової ради – Наталія Стасюк, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології, заступник директора з наукової роботи, Інститут біології клітини НАН України. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Андрій Сибірний, доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, директор, Інститут біології клітини Національної академії наук України. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Результати відкритого голосування:

«За» 5 членів ради,

«Проти» 0 членів ради.

На підставі результатів відкритого голосування разова спеціалізована вчена рада присуджує Вену Лю ступінь доктора філософії з галузі знань 09 – біологія за спеціальністю 091 – біологія.

Відеозапис трансляції захисту дисертації додається.

Голова разової спеціалізованої вченої ради



(підпис)

Наталія СТАСЮК

(власне ім'я та прізвище)

Підпис Стасюк Н.
ЗАСВІДЧУЮ



Барська М.Л.