

До разової спеціалізованої вченої ради
ДФ 35.246.005
Інституту біології клітини НАН України
м. Львів, вул. Драгоманова 14/16

В І Д Г У К

офіційного опонента, доктора біологічних наук, головного наукового співробітника Львівського національного університету імені Івана Франка Осташа Богдана Омеляновича на дисертаційну роботу ЛЮ Вена (LIU Wen)

на тему: „Нові дані щодо ролі *GND1*, *RIB6*, *RFE1* та деяких інших генів у надсинтезі рибофлавіну дріжджами *Candida famata*” (New findings on the role of *GND1*, *RIB6*, *RFE1* and some other genes on riboflavin oversynthesis of the yeast *Candida famata*), представленої на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність дисертації. Рибофлавін (синонім: вітамін В₂) – промислово важлива низькомолекулярна сполука, що виробляється за допомогою мікроорганізмів у масштабі тисяч тон. Рибофлавін використовують як медичний препарат (для лікування арибофлавінозів), кормову добавку, кольорант у харчовій промисловості. Враховуючи масштаб виробництва цієї сполуки, навіть кількавідсоткове підвищення рівня її продукції мікробами матиме чималий економічний ефект. Цікавими є також питання природної появи, еволюції та генетичної регуляції метаболічних шляхів синтезу рибофлавіну. Їхнє розуміння сприятиме спробам метаболічної інженерії надпродуцентів цієї та споріднених сполук. Отже, дисертаційна робота Лю Вена – актуальна, має важливе теоретичне та практичне значення.

Зв'язок з державними чи галузевими науковими програмами. Робота дисертанта є частиною фундаментальних досліджень відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України за темами: «Генетичний контроль біосинтезу та транспорту рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (№ держ. реєстрації 0115U001362, 2015 – 1019); «Генетичні та біохімічні аспекти регуляції деяких катаболічних та анаболічних процесів у мікроорганізмів: алкогольної ферментації, катаболізму метанолу, біосинтезу флавінів, гліцерину, водню та глутатіону»; «Вивчення механізму дії нових генів в регуляції синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Candida famata*»; «Ідентифікація та з'ясування ролі нових структурних та регуляторних генів у надсинтезі рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (0121U10926, 2021-2025). Частина експериментальної роботи виконана у межах досліджень за грантом

Польського національного наукового центру, Opus UMO-2018/29/B/NZ1/01-497 – «Regulatory mechanism involved in riboflavin overproduction in the flavinogenic yeast *Candida famata*». Автор дисертаційної роботи - один із виконавців вищезгаданих науково-дослідних тем.

Наукова новизна дослідження. Вперше для флавіногенних дріжджів *Candida famata* застосовано методи метаболічної інженерії для підвищення продукції рибофлавіну за рахунок генетичних маніпуляцій окремими генами біосинтезу попередників цієї сполуки (а саме рибібулозо-5-фосфату, Ru5P), а також генами транспорту та регуляції – на основі як вихідних штамів, так і тих, що вже пройшли інші етапи підвищення продукції рибофлавіну. Також вперше ці генетично сконструйовані штами дослідили з використанням низки нових субстратів наближених до промислових – зокрема відходи виробництва сиру та пива.

Практичне значення отриманих результатів. Здобувачем доведена перспективність низки генів як нових мішеней для метаболічної інженерії стабільних набувців рибофлавіну на основі *C. famata*. Це дасть змогу повернути *C. famata* на арену промислового виробництва рибофлавіну.

Ступінь обґрунтованості та достовірність висновків та результатів. Дисертація є цілісним дослідженням, її мета і завдання сформульовані ясно і змістовно. Лю Вен застосував у своїй роботі сучасні і доречні методи молекулярної мікробіології, генетичної інженерії та аналітичної біохімії. Результати опрацьовано статистично та обговорено з урахуванням сучасної наукової літератури, і сповна презентовано на низці національних та міжнародних конференцій. Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Висновки, зроблені здобувачем, логічно випливають з отриманих результатів. Тому достовірність положень та висновків дисертації безсумнівна.

Повнота викладу основних положень дисертації в опублікованих працях. Матеріали дисертації сповна відображено у публікаціях. Зокрема, за темою дисертації опубліковано 4 статті, всі у виданнях, що входять до наукометричної бази Scopus (з них дві Q1/Q2) і мають імпакт-фактор. Здобувач оприлюднив результати своїх досліджень на багатьох міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах і симпозіумах.

Оцінка змісту дисертаційної роботи та її завершеності. Дисертаційна робота складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел, що налічує 202 статті, та одного додатку. Роботу викладено на 159 сторінках друкованого тексту, що містить 30 рисунків і чотири таблиці. У вступі обґрунтовано актуальність обраної теми досліджень, її зв'язок з напрямом наукових досліджень установи, де виконано роботу, новизну і практичне значення, описано обсяг і структуру дисертації. У першому розділі підсумовано наявну інформацію про флавіногенез та три основні промислові продуценти рибофлавіну. У другому розділі викладено матеріали і методи досліджень. У третьому розділі описано результати досліджень. Ці фокуси роботи такі гени: *GND1* (6-фосфоглюконатдегідрогеназа), *ZWF1* (глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа), *RIB6* (3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза, або

DHBP-синтаза), *RFE1* (екскретаза рибофлавіну), *SEF1* (транскрипційний регулятор), *VMA1* (вакуолярна АТФаза). Спочатку дисертант дослідив надекспресію генів пентозософатного шляху як спосіб підвищення продукції рибофлавіну. Створені відповідні плазміди, досліджені їхні ефекти на основі різних генотипів *C. famata*. Далі Лю Вен дослідив, як промотори гена *SEF1* різного походження впливають на продукцію рибофлавіну. Насамкінець досліджений вплив делеції гена вакуолярної АТФази на рівень продукції рибофлавіну. У четвертому розділі – узагальнення і обговорення отриманих результатів.

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.

Загальний висновок. Дисертаційна робота Лю Вена „Нові дані щодо ролі *GND1*, *RIB6*, *RFE1* та деяких інших генів у надсинтезі рибофлавіну дріжджами *Candida famata*” – завершена наукова праця, в якій ідентифіковано та з’ясовано закономірності дії низки чинників, залучених у регуляцію біосинтезу рибофлавіну у дріжджів *C. famata*. За структурою та змістом, актуальністю, новизною, практичним значенням, ступенем достовірності та обґрунтованості результатів та повнотою їхнього викладення у публікаціях, вищезазначена дисертація повністю відповідає 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, Лю Вен, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент:

Доктор біологічних наук,
гол. н.с. кафедри генетики та біотехнології
Львівського національного університету
імені Івана Франка
21 березня 2025 р.

Богдан ОСТАШ