

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу **Лю Вена (LIU Wen)**

«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*»), представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії галузі знань 09 «біологія» за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність обраної теми дисертації. У роботі досліджено вплив низки генів, що беруть участь у синтезі вітаміну B₂, його попередника рибулозо-5-фосфату та екскреції цього вітаміну в середовище, на продукцію рибофлавіну флавіногенними дріжджами *Candida famata* та подальшого застосування цих знань для створення стабільних надпродуцентів рибофлавіну.

Робота є актуальною, так як рибофлавін необхідний для правильного функціонування метаболічних шляхів, але люди та тварини не здатні його синтезувати. Рибофлавін використовується як додаток до кормів у сільському господарстві, як жовтий барвник у харчовій промисловості та як лікарський засіб у медицині.

Виробництво рибофлавіну шляхом мікробної ферментації має переваги над хімічним синтезом. Дріжджі *C. famata* можна використовувати для промислового виробництва рибофлавіну якщо прибрати такий недолік, як низька генетична стабільність промислового штаму дріжджів.

Тому дослідження впливу генів, залучених у пентозофосфатний шлях, а також нових факторів в регуляцію біосинтезу рибофлавіну *C. famata* є актуальним завданням для подальшого створення ефективного штаму-продуценту рибофлавіну.

Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами. Робота виконувалась як одна з частин фундаментальних досліджень у відділі молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України за темами: «Генетичний контроль біосинтезу та транспорту рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (номер державної реєстрації 0115U001362, 2015-2019);

«Генетичні та біохімічні аспекти регуляції деяких катаболічних та анаболічних процесів у мікроорганізмах: спиртового бродіння, катаболізму метанолу, біосинтезу флавінів, гліцерину, водню та глутатіону» (Рішення Експертної ради з питань оцінки тем фундаментальних досліджень НАН України від 17.06.2015 № 3, 2016-2019); «Дослідження механізму дії нових генів у регуляції синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Candida famata*» (Постанова Бюро ВБФМБ НАН України від 02 жовтня 2018 р. № 5, номер державної реєстрації 0119U001677, 2019-2020); «Ідентифікація та з'ясування ролі нових структурних і регуляторних генів у надсинтезі рибофлавіну у флавіногенних дріжджах» (Постанова Бюро НАН України від 26 листопада 2020 р. № 4, № держреєстрації 0121U10926, 2021-2025). Частину експериментальної роботи було виконано в рамках дослідження в рамках гранту Польського національного наукового центру Opus UMO-2018/29/B/NZ1/01-497 – «Регуляторний механізм, залучений до гіперпродукції рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Candida famata*».

Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, сформованих у роботі. Дисертація Лю Вена є завершеною науковою роботою, що містить всі необхідні структурні елементи від обґрунтування актуальності та стратегії дослідження до аналізу отриманих результатів та висновків. Частини дисертаційної роботи викладені послідовно та логічно пов'язані між собою. Наведено обґрунтування для вибору кожного методу дослідження, всі експериментальні дані супроводжуються відповідним аналізом. Експериментальні результати було опрацьовано з використанням загально прийнятих методів статистичної обробки даних.

Також було проведено порівняння отриманих результатів з даними, описаними у світовій літературі іншими дослідниками. Виходячи з узагальнення результатів дисертації, було показано, що мета дисертаційної роботи була повністю досягнута в ході виконання дослідження, а дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною працею. Завершується робота вичерпними розгорнутими висновками, які логічно описують отримані результати та відображують наукове та практичне значення дисертаційної роботи.

Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях. Ключові положення дисертаційної роботи було висвітлено у наукових працях дисертанта. За темою дисертації опубліковано одинадцять наукових праць, у тому числі чотири статті в міжнародних виданнях, що індексуються в базах даних Scopus та Web of Science Core Collection, та сім тез доповідей у матеріалах конференцій, наукових симпозіумів, конгресів. Наукові публікації за темою дисертації відповідають чинним вимогам законодавства України.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності. У дисертаційній роботі чітко та науково коректно сформульовано мету, яка відображається у поставлених завданнях, визначено об'єкт та предмет роботи. Вичерпно обґрунтовано актуальність поставленої проблеми та використання тих чи інших експериментальних методів. Викладення експериментального матеріалу структурно та змістовно відповідає поставленим завданням.

Розглянувши звіт подібності за результатами перевірки дисертаційної роботи на текстові співпадиння, можна зробити висновок, що дисертаційна робота Лю Вена є результатом самостійних досліджень здобувача і не містить елементів фальсифікації, компіляції, фабрикації, плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають належні посилання та відповідне джерело.

Дисертація складається з «Анотації», «Вступу», «Огляду літератури», «Матеріалів та методів дослідження», «Результатів», «Обговорення», «Висновків», «Списку літератури» та «Додатку». Дисертація викладена на 159 сторінках друкованого тексту, з яких основна частина займає 93 сторінки. Робота містить 34 рисунки, 4 таблиці та 1 формулу. Список використаної літератури включає 202 літературних джерела. В кінці роботи прикладено один додаток.

Огляд літератури обґрунтовує актуальність отримання рибофлавіну мікробіологічним способом та описує шляхи регуляції біосинтезу рибофлавіну та вивчення механізмів створення надпродуцентів.

Розділ «Матеріали та методи» містить вичерпний та детальний опис матеріалів та методів, використаних в ході експериментального дослідження. Так, описано процеси культивування та середовища для культивування

досліджуваних дріжджів та бактерій, праймери та плазміди, використані в роботі, основні молекулярно-генетичні методи, трансформація клітин, кількісну ПЛР в реальному часі, різні біохімічні методи аналізу, програмні засоби та статистичні методи аналізу.

В розділі 3 (експериментальна робота) описано конструювання рекомбінантних штамів *C. famata* шляхом одночасної надекспресії трьох генів: *GND1*, *RIB6* та *RFE1*, які кодують 6PGDH, DHBP-синтазу та ескретазу рибофлавіну, відповідно. Показано, що експресія різних комбінацій двох генів, а також коекспресія всіх трьох генів призводила до збільшення продукції рибофлавіну в *C. famata* VKM Y-9 у різних середовищах. Було показано, що рекомбінантний штам, з коекспресією трьох генів, характеризувався 3,3-кратним зростанням продукції рибофлавіну в сироватці порівняно з вихідним штамом.

Іншою частиною роботи було конструювання мутанта *C. famata* з пошкодженим геном *VMA1*, який кодує α -субодиницю вакуолярної АТФ-ази. Мутант *vma1 Δ* виявляв 9,4-кратне збільшення продукції рибофлавіну порівняно з вихідним штамом L2.

У дисертаційній роботі також досліджено вплив промоторів гена *SEF1* різних дріжджів на продукцію рибофлавіну. Виявлено, що рекомбінантні штами, які експресують ген *SEF1* під контролем промоторів з дріжджів *C. famata*, *Candida albicans* і *Candida tropicalis* збільшували продукцію рибофлавіну в 18,8, 19,4 і 13,5 разів порівняно з вихідним штамом L2, відповідно. Описано конструювання рекомбінантного штаму V9/RFE1-RIB6-GND1 з коекспресією генів *REF1*, *RIB6*, та *GND1*. Отриманий штам V9/RFE1-RIB6-GND1 характеризувався збільшеним продукуванням рибофлавіну за культивування в середовищі на основі молочної сироватки.

Всі розділи дисертаційної роботи логічно відповідають поставленим завданням.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів» містить порівняння отриманих результатів із сучасними світовими розробкам у галузі створення ефективних штамів-продуцентів рибофлавіну.

У висновках розкрито як наукове, так і практичне значення дисертації.

Ознайомлення з текстом дисертації дає підстави стверджувати, що за структурою та змістом він відповідає вимогам, що висуваються МОН України. У тексті відображено основні положення, зміст, результати і висновки здійсненого Лю Веном дисертаційного дослідження.

Наукова новизна. Вперше виявлено, що надмірна експресія гена *GND1* збільшує біосинтез рибофлавіну в дріжджах *C. famata*, тоді як надмірна експресія гена *ZWF1* значно знижує виробництво рибофлавіну та ріст клітин.

Збільшено потік Ru5P до біосинтезу рибофлавіну шляхом ко-надекспресії генів *GND1*, *RIB6* (кодує DHBP-синтазу, відповідає за перетворення Ru5P) і *RFE1* (кодує білок Rfe1, відповідальний за виведення рибофлавіну), що призвело до 3,3-кратного збільшення продукції рибофлавіну дріжджами *C. famata* VKM Y-9. Встановлено, що експресія гена *SEF1* (кодує фактор транскрипції Sef1, який є позитивним регулятором) тільки під промоторами флавіногенних дріжджів призводить до збільшення продукції рибофлавіну. Вперше показано, що ген *IMA1* (кодує α -субодиницю вакуолярної АТФази) діє як негативний регулятор біосинтезу рибофлавіну для дріжджів *C. famata*.

Практичне значення одержаних результатів. В ході роботи виявлено гени та фактори біосинтезу рибофлавіну, які можуть бути використані для конструювання нових надійних надпродуцентів на вдосконаленому надпродуценті BRPI шляхом комбінування та модифікації їх експресії. Отримані штами можуть бути надійними та конкурентоспроможними продуцентами рибофлавіну. Це дасть змогу використовувати отримані штами у промисловому виробництві.

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.

Загальний висновок. Таким чином, дисертаційна робота Лю Вена «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*») являє собою закінчену науково-дослідну роботу, яка містить інформацію про конструювання рекомбінантного штаму, що характеризувався збільшеною продукцією рибофлавіну. Актуальність обраної проблеми, високий методичний рівень проведених досліджень, наукове й практичне значення отриманих результатів дозволяє вважати, що дисертаційна робота Лю Вена відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (Постанова Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44) та наказу МОН України від 12.01.2017 р. № 40 «Про

затвердження Вимог до оформлення дисертації». Здобувач заслуговує на присудження ступеня доктора філософії галузі знань 09 «біологія» за спеціальністю **091 – біологія**.

Офіційний опонент:

Заступник директора з наукової роботи

ДУ «Інститут харчової біотехнології

та геноміки НАН України»,

доктор біологічних наук, професор

Сергій ШУЛЬГА