

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Васишин Роксолани
Василівни “Конструювання поліпшених продуцентів етанолу та
глутатіону у дріжджів *Ogataea polymorpha*”, подану на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю
03.00.07 - мікробіологія.

Актуальність теми. На сьогодні розвиток будь-якої держави визначається рівнем біотехнологічних процесів, впроваджені у виробництво. Одними з найбільш актуальних є питання одержання екологічно безпечного і дешевого паливного матеріалу, зокрема – біоетанолу. Важливе економічне та екологічне значення має розроблення ефективних технологій для виробництва паливного етанолу з дешевої поновлюваної сировини - лігноцелюлозних залишків аграрної та деревообробної промисловостей. На сьогодні практично весь етанол отримується шляхом мікробної ферментації з харчової сировини, зазвичай, цукру або крохмалю. Важливим є пошук та створення генетично модифікованих організмів, здатних до гідролізу та подальшого зброджування вивільнених цукрів. До природних ферментуючих ксилози видів дріжджів належать *Ogataea polymorpha*, які були використані у відповідній роботі.

Дана дисертаційна робота містить низку підходів, які б забезпечили збільшення конверсії ксилози до етанолу, а також утворення глутатіону дріжджами *Ogataea polymorpha*. Раніше за допомогою поєднання метаболічної інженерії та класичної селекції було отримано рекомбінантні штами дріжджів *O. polymorpha* з підвищеною ефективністю високотемпературної алкогольної ферментації ксилози, однак споживання ксилози цими штамами було повільним та неповним. Таким чином, дослідження метаболізму ксилози є важливим для розробки підходів до збільшення конверсії ксилози до етанолу та отримання штамів дріжджів з покращеною алкогольною ферментацією цього цукру. Також, у роботі висвітлені дослідження щодо створення ефективних продуцентів глутатіону, оскільки постійне зростання попиту на глутатіон, зумовлене широким використанням цього пептиду як компонента лікарських

засобів, продуктів харчування та косметичних засобів, стимулює пошук нових або покращення наявних штамів-продуцентів цього трипептиду.

Для вирішення поставлених завдань Роксолана Васишин використала широкий спектр молекулярно-генетичних методів та інших сучасних методів дослідження. У роботі використано методи комп'ютерного аналізу та комп'ютерні бази даних відомих генів.

Новизна дослідження. За результатами проведених досліджень було вперше сконструйовано модифіковані форми транспортера *Hxt1* *O. polymorpha* та отримано штами цього виду дріжджів з посиленою експресією ізоформ гена *HXT1*, що кодує нативну або модифіковані форми транспортера *Hxt1*. За допомогою флуоресцентної мікроскопії підтверджено, що мутагенез транспортера *Hxt1* обумовлює збільшення тривалості локалізації цього білка в мембрані клітин *O. polymorpha* за наявності ксилози як вуглецевого субстрату. Сконструйовано штами дріжджів *O. polymorpha* з модифікованим генами *HXT7* та *Gal2* *S. cerevisiae* та встановлено, що введення модифікованих транспортерів *Hxt1* *O. polymorpha* в геном покращеного продуцента етанолу з ксилози обумовлює одночасне споживання глюкози і ксилози за умов високотемпературної алкогольної ферментації 7% глюкози та 3% ксилози. Виявлено, що посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2*, що кодують пероксисомні ферменти в геномі штаму *O. polymorpha* з найвищим рівнем алкогольної ферментації ксилози збільшує в 1,3 раза продукцію етанолу. Також, сконструйовано штами дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону за рахунок надекспресії гена транскрипційного активатора *Met4* та гена першого фермента біосинтезу глутатіону *GSH2* та встановлено позитивний вплив підвищеного рівня внутрішньоклітинного глутатіону на продукцію етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації при 45⁰С у *O. polymorpha*.

Практичне значення результатів досліджень. Отримані рекомбінантні штами дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним рівнем продукції етанолу під час алкогольної ферментації суміші цукрів глюкози та ксилози або штами дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним рівнем продукції глутатіону можуть бути

перспективними для впровадження у виробництво або використовуватись як вихідні на наступних етапах метаболічної інженерії для подальшого підвищення продукції цих сполук. Опрацьовані у роботі підходи і отримані рекомбінантні молекули ДНК можуть використовуватись для метаболічної інженерії інших штамів *O. polymorpha* або навіть інших видів дріжджів.

Особистий внесок здобувача. Практично вся експериментальна частина дисертаційної роботи була виконана здобувачем особисто, за винятком деяких експериментів, що проводилися спільно з співробітниками відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Наукові положення дисертації випливають з аналізу значної і цілком достатньої кількості експериментальних досліджень, проведених з використанням сучасних генетичних, біохімічних та мікробіологічних методів. Статистична обробка цифрового матеріалу, отриманого у дослідженнях, які повторювали тричі з трьома паралельними експериментами у кожному варіанті, дала змогу одержати достовірні і переконливі результати.

Сформульовані наукові положення та висновки даної наукової праці обґрунтовані та достовірні.

Зміст автореферату повністю відповідає основним положенням дисертаційної роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Результати досліджень достатньо повно висвітлені в публікаціях. За темою дисертаційної роботи опубліковано у співавторстві 4 статті у міжнародних виданнях Scopus та одну монографію, 22 тези доповідей у матеріалах Міжнародних конференцій, наукових з'їздів та конгресів. Основні результати роботи були представлені у вигляді стендових та усних доповідей на конференціях та з'їздах.

За обсягом та структурою дисертація Васишин Р.В. відповідає вимогам ДАК України. В огляді літератури узагальнено інформацію про продукцію

етанолу другого покоління за допомогою дріжджів, властивості та способи продукції і використання глутатіону, метаболізм цієї сполуки у клітинах дріжджів, охарактеризовано методи метаболічної інженерії, які використовувалися для підвищення ефективності продукції етанолу або глутатіону у *O. polymorpha*. Робота добре ілюстрована, вона містить 32 рисунки та 7 таблиць.

Зауваження щодо дисертації:

1. У тексті дисертації і в авторефераті зустрічаються незначні неточності і друкарські помилки.
2. У роботі зустрічається лабораторний жаргон, зайві іншомовні запозичення й кальки, як-от "рестрикція ДНК" та інш. Автору слід притримуватися єдиної системи позначень.
3. У кінці роботи доцільно було б представити таблицю, де дані щодо продукції етанолу чи глутатіону отриманими рекомбінантними штамми порівнюються з даними, представленими в науковій літературі для продуцентів відповідних сполук.

Зазначені недоліки не знижують загальної високої позитивної оцінки дисертаційної роботи.

Важливими для оцінювання роботи є також міркування автора щодо перспективності опрацьованих підходів до одержання високо продуктивних штамів-продуцентів етанолу.

Тож питання до автора дисертаційної роботи:

1. Чи вважаєте ви досягнуті характеристики одержаного штаму *Ogataea polymorpha* достатньо ефективними для впровадження його як продуцента етанолу у промислове використання? Які шляхи (напрямки чи вплив окремих факторів) можуть розглядатися для подальшого удосконалення його властивостей чи, відповідно до ваших підходів, потенціал поліпшення відповідних характеристик *Ogataea polymorpha* є вичерпаний?

2. Які можливості використання опрацьованих вами підходів для одержання етанолу для створення антисептиків, що є вельми актуальним в умовах коронавірусної пандемії.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Опрацьовані дисертантом методичні підходи до метаболічної інженерії дріжджів *O. polymorpha*, а також сконструйовані в ході роботи штами та рекомбінантні молекули ДНК можуть бути використані у наукових закладах, де вивчають біологію дріжджів, та біотехнологічних підприємствах. Їх можна використати в навчальних закладах України під час підготовки фахівців - генетиків, мікробіологів та біотехнологів.

Висновок про відповідність дисертації вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника За своєю актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, обґрунтованістю сформульованих наукових положень та достовірністю висновків дисертаційна робота «Конструювання поліпшених продуцентів етанолу та глутатіону у дріжджів *Ogataea polymorpha*» повністю відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567 зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р. та №1159 від 30.12.2015 р.), а її автор, Василичин Роксолана Василівна, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю – 03.00.07 – мікробіологія.

доктор медичних наук, професор,

завідувач кафедри мікробіології

Львівського національного медичного університету

імені Данила Галицького

Підпис Корнійчук О.П. за свідчую

Вчений секретар



Корнійчук О.П.