РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу ЛЮ ВЕНА «**Нові дані щодо ролі *GND1*, *RIB6*, *RFE1* та деяких інших генів у надсинтезі рибофлавіну дріжджами *Candida famata***», що подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальності 091 – Біологія, галузь знань 09 – Біологія

Ознайомившись із дисертаційною працею ЛЮ ВЕНА, вважаю, що вона є сучасним і актуальним науковим дослідженням на перетині мікробної біотехнології та метаболічної інженерії, спрямованим на створення ефективних генетично модифікованих дріжджових продуцентів рибофлавіну.

Актуальність теми дослідження. Збільшення продуктивності дріжджів, що синтезують рибофлавін (вітамін B_2), безперечно, є важливим напрямом сучасних біотехнологічних досліджень. Рибофлавін відіграє ключову роль у метаболічних процесах живих організмів, оскільки, є попередником коферментів флавопротеїнів – флавін мононуклеотиду (ФМН) та флавін аденін динуклеотиду (ФАД). Світовий ринок рибофлавіну, обсяг якого у 2023 році сягнув приблизно 13,46 млрд доларів США, демонструє його широке використання як компонента лікарських засобів, харчових продуктів, косметики та кормових добавок у тваринництві.

На сьогоднішній день промислове виробництво рибофлавіну базується на використанні штамів нитчастого гриба *Ashbya gossypii*, та грампозитивних бактерії *Bacillus subtilis. C. famata* мають ряд переваг перед штамами *B. subtilis* та *A. gossypii*: вони не чутливі до фагових інфекцій, а також мають коротший час ферментації. Тому, дослідження, спрямовані на розробку ефективних технологій виробництва рибофлавіну з використанням генетично модифікованих штамів *C. famata*, є надзвичайно актуальними у зв'язку із зростаючим попитом на цей вітамін та необхідністю зниження витрат на виробництво.

Наукова новизна. На відміну від існуючих досліджень, присвячених регуляції експресії генів біосинтетичного шляху флавіногенезу, представлена робота розкриває нові відомості про біосинтез рибофлавіну у *C. famata*. Вперше було продемонстровано, що надмірна експресія *GND1*, який кодує 6-фосфоглюконатдегідрогеназу, значно підвищує продукцію вітамін B_2 у *C. famata*. Застосування комбінаторного підходу дозволило створити генетично модифіковані штами *C. famata,* які характеризуються надекспресією *GND1, RIB6* (що кодує D-рибулозо-5-фосфат-4-епімеразу) та *RFE1* (що кодує експортер рибофлавіну). Це призвело до підвищення внутрішньоклітинного рівня рибулозо-5-фосфату (Ru5P) та 3,3-кратного зростання виробництва рибофлавіну. Крім того, було досліджено нові зовнішні регуляторні фактори, що впливають на шлях біосинтезу вітаміну. Зокрема, було показано, що експресія гена *SEF*1 (що кодує транскрипційний фактор *Sef1*) позитивно впливає на виробництво рибофлавіну, тоді як ген *VMA1* (що кодує α-субодиницю вакуолярної АТФази) проявляє властивості негативного регулятора у *C. famata*.

Практичне значення. Практичне значення наукових результатів полягає у потенційній можливості використання виявлених закономірностей регуляції синтезу рибофлавіну для розробки нових стабільних суперпродуцентів. Штами, що надмірно продукують рибофлавін, як надійні та конкурентоздатні, можуть бути використані в промисловості.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Результати, представлені в роботі, ґрунтуються на власних дослідженнях автора дисертації, їх отримано з використанням сучасного підходу біотехнології – метаболічної інженерії. У роботі представлено 4 висновки, які відповідають отриманим результатам.

Особистий внесок здобувача. Безпосередня участь автора у проведенні дослідження, що охоплює отримання, аналіз та інтерпретацію експериментальних даних, простежується впродовж усієї дисертаційної роботи. Автором особисто сформульовано основні положення та висновки дослідження, а також розроблено план експериментальних дослідженнь у співпраці із науковим керівником. Автор самостійно, та інколи за окремими консультаціями з керівником, визначав оптимальні методи для досягнення поставлених експериментальних цілей. Крім того, здобувач брав активну участь у підготовці наукових публікацій, що відображають результати дослідження. Результати, представлені в дисертації, отримано у співпраці зі співавторами, що відмічено відповідними посиланнями, які відображають їх внесок та попередні розробки.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднено у формі наукових статей у фахових виданнях та представлено у вигляді тез на наукових конференціях. Загалом за темою дисертації опубліковано одинадцять наукових праць, серед яких чотири статті у виданнях, що індексуються в базах даних Scopus та Web of Science Core Collection, та сім тез доповідей, опублікованих у матеріалах конференцій, наукових симпозіумів та конгресів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із наступних розділів: «Анотація», «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати», «Обговорення», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додаток». Дисертацію викладено на 159 сторінках друкованого тексту, з яких основний зміст займає 101 сторінку. Робота ілюстрована 34 рисунками, містить 4 таблиці та 1 формулу. Список використаної літератури включає 202 джерела.

Зауваження та запитання.

Розділі 4. ОБГОВОРЕННЯ. Сторінка 127. Ви зазначаєте значне зростання експресії *ZWF1* та активності G6PDH у рекомбінантних штамів *C. 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

C. 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 трансформантаів, що характеризуються надекспресію 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 *C. 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?

Висновок: Дисертаційна робота ЛЮ ВЕНА на тему «**Нові дані щодо ролі *GND1*, *RIB6*, *RFE1* та деяких інших генів у надсинтезі рибофлавіну дріжджами *Candida famata***» заслуговує на високу оцінку. Ця робота за актуальністю, новизною результатів, науково-практичною цінністю, обґрунтованістю **відповідає** пп. **6, 7, 8 «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 р. №44, наказу МОН України No 40 від 12.01.2017р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», та відповідає напрямку наукового дослідження освітньо-наукової програми Інституту біології клітини НАН України з галузі знань 09 – Біологія зі спеціальності 091 – Біологія.

Рецензент
кандидат біологічних наук,
науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології
Інституту біології клітини НАН України О. М. ДЕМКІВ

27.03.2025