

ВІДГУК РЕЦЕНЗЕНТА

на дисертацію аспіранта ЛЮ Вена

«Нові дані щодо ролі *GND1*, *RIB6*, *RFE1* та деяких інших генів у надсинтезі рибофлавіну дріжджами *Candida famata*»

представлену на здобуття наукового ступеня
доктора філософії (PhD) за спеціальністю 091 Біологія,
з галузі знань 09 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційного дослідження. Рибофлавін (вітамін B₂), відіграє важливу роль у метаболізмі живих організмів. Насамперед, ця речовина є попередником коферментів флавопротеїнів – флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД). Рибофлавін не синтезується в клітинах тварин. Тому вітамін B₂ знаходить своє застосування у медицині, косметології, а також, як додаток до кормів у сільському господарстві, як барвник у харчовій промисловості. Ринок цього вітаміну становить близько 400 млн. американських доларів на рік, крім того, спостерігається тенденція до зростання цього показника у найближчі роки. Отже, рибофлавін займає важливе місце серед продуктів біотехнології.

На сьогодні комерційна продукція рибофлавіну базується на використанні штамів бактерій *Bacillus subtilis* та цвілевих грибів *Ashbya gossypii*. Раніше використовували також штам *der8* флавіногенних дріжджів *Candida famata*, але його застосування в промисловому виробництві припинили, в основному, через низьку стабільність продуцентів.

Шляхи біосинтезу рибофлавіну у мікроорганізмів та рослин відомі, однак, механізми регуляції цих процесів вивчені недостатньо. Таким чином, поглиблення знань про регуляцію флавіногенезу у мікроорганізмів, у тому числі у дріжджів, може допомогти в конструюванні поліпшених продуцентів та, в перспективі, в удосконаленні процесів промислового синтезу цього вітаміну. Отже, своєчасність та актуальність теми дисертаційного дослідження ЛЮ Вена «Нові дані щодо ролі *GND1*, *RIB6*, *RFE1* та деяких інших генів у надсинтезі рибофлавіну дріжджами *Candida famata*» не викликає сумнівів.

Наукова новизна отриманих результатів. Досліджено вплив надекспресії двох генів *ZWF1* та *GND1*, які кодують ключові ферменти окисного етапу пентозофосфатного шляху, на біосинтез рибофлавіну дріжджами *C. famata*. Показано, що надмірна експресія гена *ZWF1* (кодує глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу) призводить до негативного ефекту у *C. famata*, особливо у надпродуцента рибофлавіну BRP. На відміну від цього, надмірна експресія гена *GND1* 6-фосфоглюконатдегідрогенази підвищувала продукцію рибофлавіну в 1,9 рази порівняно з батьківським штамом.

Вперше досліджено вплив підвищеної експресії трьох генів *RFE1* (кодує рибофлавін-екскретазу), *GND1* (кодує 6-фосфоглюконатдегідрогеназу) та *RIB6* (3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазу) на синтез рибофлавіну флавіногенними дріжджами *C. famata*. Штам, сконструйований для спільної надекспресії всіх трьох генів, демонстрував до 3,3-кратне збільшення продукції рибофлавіну в молочній сироватці порівняно з батьківським штамом BKM Y-9.

Виявлено, що експресія промоторів фактора транскрипції гена *SEF1* флавіногенних дріжджів *C. famata*, *C. albicans* і *C. tropicalis* покращує ріст клітин і значно збільшує продукцію рибофлавіну у мутанта L2 $\Delta sef1$.

Штам *C. famata* L2 *vma1Δ* з пошкодженим геном, що кодує α -субодиницю вакуолярної АТФ-ази, характеризувався у 9 разів більшою продукцією рибофлавіну порівняно з батьківським штамом. Підтверджено, що ген *VMA1* є негативним регулятором біосинтезу рибофлавіну для дріжджів *C. famata*.

Значущість дослідження для науки і практики та шляхи його використання. Вивчені принципи регуляції синтезу рибофлавіну кількома факторами, представлені в роботі, можуть бути використані в майбутньому для конструювання нових стабільних суперпродуцентів шляхом комбінування та модифікації експресії декількох регуляторних білків. Можливо, такі штами, за умови їх стабільності, зможуть конкурувати зі штамом *C. famata* der8, який свого часу використовувався в промисловості. Потенційно це дозволить впровадити відповідні штами у промислове виробництво на біотехнологічних підприємствах.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Результати, висвітлені у роботі, базуються на власних дослідженнях дисертанта, з використанням сучасного підходу біотехнології - метаболічної інженерії. У роботі наведено чотири висновки, що відповідають отриманим результатам.

Робота містить положення і висновки, сформульовані дисертантом особисто. План проведення досліджень для виконання завдань було визначено із допомогою наукового керівника, д.б.н., проф., акад. Сибірського А.А. Спільно із науковим керівником дисертант аналізував результати експериментальних досліджень. Здобувач, іноді з допомогою наукового керівника, займався пошуковою роботою для підбору найкращого методу чи методики, аби досягнути поставленої мети експерименту. Підготовка наукових публікацій проводилася здобувачем за консультативної підтримки наукового керівника. Представлені у дисертації результати досягнуто проведенням наукових досліджень у співпраці зі співавторами публікацій. Аналіз отриманих результатів здійснювався спільно з науковим керівником.

Основні наукові результати дисертаційної роботи висвітлено в 11 наукових працях, серед яких: чотири статті у фахових наукових виданнях, у тому числі дві у закордонних виданнях з Q1 та Q2; та у семи тезах доповідей на міжнародних наукових конференціях в Україні та за кордоном.

Оцінка змісту та завершеності дисертаційного дослідження.

Дисертація ЛЮ Вена оформлена відповідно до новітніх вимог, передбачених Наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року № 40 зі змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства освіти і науки № 759 від 31 травня 2019 року.

Дисертація складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел і додатку.

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

1. Ефект делеції гена *IMA1* 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 *IMA1*?
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?

Загальний висновок. Дисертаційна робота **ЛЮ Вена** на тему «Нові дані щодо ролі *GND1*, *RIB6*, *RFE1* та деяких інших генів у надсинтезі рибофлавіну дріжджами *Candida famata*» повністю відповідає вимогам наказу МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» від 12 січня 2017 р. № 40 (зі змінами), «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 (зі змінами), а її автор **ЛЮ Вен** заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю **091 Біологія**.

Рецензент

кандидат біологічних наук, доцент,

науковий співробітник відділу

аналітичної біотехнології

Інституту біології клітини НАН України

Андрій ЗАКАЛЬСЬКИЙ