

ВІДГУК

**офіційного опонента, доктора біологічних наук, головного наукового співробітника Осташа Богдана Омеляновича на дисертаційну роботу
Дзанаєвої Любові Сергіївни**

на тему: „Ідентифікація генів, залучених в регуляцію алкогольної ферmentації ксилози у рекомбінантних штамів *Saccharomyces cerevisiae*”, представленої на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність дисертації. Етанол – промислово важлива сполука, яку виробляють за допомогою мікробного синтезу у масштабі мільйонів тисяч тон, і яка наразі є центральним елементом індустрії біопалива. Особливий інтерес становить виробництво паливного етанолу з сировини, що не має харчового призначення, як-от лігноцелюлоза. Для використання лігноцелюлози як джерела етанолу необхідно насамперед знайти способи ефективної ферmentації її основного п'ятиуглецевого компонента, ксилози, зокрема за присутності глукози та інгібіторних ефектів інших складових цього природного полімеру. Тому тема дисертаційної роботи Дзанаєвої Л. С. – актуальна, має важливе теоретичне та практичне значення. Виявлення генів, що задіяні в регуляцію ферmentації ксилози в модельних дріжджах *Saccharomyces cerevisiae*, що є незаперечним лідером з рівня накопичення етанолу (на глукозовмісних джерелах живлення), дасть змогу розробити покращені біотехнології ферmentації лігноцелюлози.

Зв'язок з державними чи галузевими науковими програмами. Робота дисертантки є частиною фундаментальних досліджень відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України за темою «Роль транскрипційних активаторів та репресорів в регуляції алкогольної ферmentації пентоз та гексоз» (№ держреєстрації 0120U456789, 2020-2021 рр.). Робота була підтримана грантом Польського національного наукового центру (NCN) Opus UMO-2016/21/B/NZ1/00280, а також грантами Національної академії наук України (гранти 2-19 і 31-19). Авторка дисертаційної роботи є однією із виконавиць вищезгаданих науково-дослідних тем.

Наукова новизна дослідження. Вперше висунуто і, за рахунок генетичних маніпуляцій окремими генами пероксисомних білків обґрунтовано гіпотезу про те, що пероксисоми беруть участь у регуляції алкогольної ферmentації ксилози у *S. cerevisiae*. Отримано експериментальні докази, які пов'язують пероксисому з детоксикацією активних форм кисню, що генеруються у процесі алкогольної ферmentації ксилози. На основі ксилозоферmentуючого штаму сконструйовано колекцію штамів з делецією генів *ADR1*, *CAT8*, *ASG1*, *HAP4*, *SIP4*, *TUP1* та *ZNF1* та посиленою експресією генів *ADR1*, *CAT8*, *HAP4*, *SIP4* та *ZNF1*, що кодують транскрипційні фактори. Вперше продемонстровано, що інгібування мітохондріального дихання в *S. cerevisiae* (за рахунок нокауту гена *HAP4*) веде до зростання продукції етанолу в

1,8 раза порівняно з вихідним штамом та сягає 10,4 г/л етанолу при ферментації ксилози.

Практичне значення отриманих результатів. Здобувачкою ідентифіковано нові мішенні для метаболічної інженерії рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* і сконструйовано рекомбінантний штам, продукція етанолу з ксилози у якого підвищена у 1,8 раза у порівнянні із вихідним штамом, та становить 10,4 г/л, або 0,414 г/г ксилози. Така продуктивність практично не поступається рівню, що спостерігають для найкращого природного ферментатора ксилози, *S. stipitis* (0,44 г/г ксилози), який, втім, має низку недоліків порівняно з *S. cerevisiae*. Створений у цій роботі штам стане платформою для подальшої метаболічної та еволюційної інженерії. Застосовані методи можуть бути екстрапольовані на інші перспективні продуценти для поліпшення алкогольної ферментації ксилози.

Ступінь обґрунтованості та достовірність висновків та результатів.

Дисертація є цілісним дослідженням, її мета і завдання сформульовані чітко і змістовно. Дзанаєва Л. С. застосувала 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 здобувачкою, логічно випливають з отриманих результатів. Тому достовірність положень та висновків дисертації не викликає сумніву.

Повнота викладу основних положень дисертації в опублікованих працях. Матеріали дисертації сповна відображені у публікаціях. Зокрема, за темою дисертації опубліковано 3 статті, з них дві у виданнях, що входять до наукометричної бази Scopus і мають імпакт-фактор. Здобувачка презентувала свою роботу 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, списку використаних джерел, що налічує 243 статті, головно англомовні. Роботу викладено на 161 сторінці друкованого тексту, що містить 50 рисунків і сім таблиць. 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 описано типи субстратів, що можуть використовувати дріжджі для алкогольної ферментації, метаболізм ксилози у дріжджів та бактерій, відомі спроби метаболічної інженерії *S. cerevisiae* для покращення використання ними ксилози для продукції етанолу; біологія пероксисом; генетика глукозної репресії та роль різних транскрипційних факторів у алкогольній ферментації. У другому розділі викладено матеріали і методи досліджень. У третьому розділі описано результати досліджень. Спочатку дисерантка оцінила роль пероксисом і активних форм кисню на алкогольну ферментацію ксилози у вихідному для цієї роботи штамі *S. cerevisiae* GS010. Далі Дзанаєва Л.С.

здійснила індивідуальні нокаути і надекспресії обраних генів транскрипційних факторів. Для всіх делеційних мутантів факт делеції доведено методом ПЛР, для всіх штамів вивчено базові фізіологічні показники – накопичення біомаси, накопичення етанолу, ацетату, гліцеролу тощо. Також досліджено експресію низки генів методом зворотньо-транскрипційної ПЛР у реальному часі. У четвертому розділі дисертантка підсумувала і обговорила отримані результати. Графічне узагальнення логіки роботи наведене на рис. 4.1 (стор. 123).

Зауваження щодо дисертації:

1. В методах і в результатах дисертації немає згадки про верифікацію плазмід експресії генів методами секвенування ДНК. Наскільки здобувачка впевнена, що використані конструкції не містять сторонніх генетичних перебудов чи помилок ПЛР, які впливатимуть на отримані результати?
2. На мою думку, авторка надто широко тлумачить, що можна назвати регулятором певного процесу чи доказом залучення певного транскрипційного фактора до регуляції певного процесу (тут – бродіння на ксилозі). Так, на основі даних аналізу фізіологічних показників культур з делецією гена білка Tip1 дисертантка стверджує (стор. 94), що “... регулятор транскрипції Tip1 залучений у процес бродіння, оскільки делеція *TUP1* негативно впливає на алкогольну ферментацію ксилози та глюкози”. Однак зміни в рівнях накопичення етанолу у відповідних штамах тісно пов’язані зі змінами накопичення біомаси. Тобто зниження рівня продукції у цьому випадку, якщо перерахувати на одиницю ваги культури буде, імовірно, у межах похибки. Очевидно, маємо справу з непрямим впливом певного транскрипційного фактора на алкогольну ферментацію, що варто було б зазначити в роботі.
3. Аналогічно, вплив Sip4 (стор. 102) на алкогольну ферментацію ксилози теж не можна вважати прямим чи справді регуляторним (тобто таким, що змінюється в часі і має безпосередній ефект на досліджувану ознаку). Тут транскрипційний фактор, змінюючи потік певних інтермедіатів через метаболічні шляхи, непрямо знижує вихід етанолу. У складних, взаємопов’язаних метаболічних шляхах такі ефекти можна спостерігати доволі часто. На складнощі інтерпретації таких результатів вказують і дані самої авторки. Якщо нокаут *SIP4* приводить до зниження рівня продукції етанолу (тобто ε, формально, активатором), то як тоді тлумачити ще більше зниження продукції при надекспресії гена *SIP4*?

Ці зауваження не впливають на висновки роботи та не знижують її практичного значення й високої оцінки.

Загальний висновок. Дисертаційна робота Дзанаєвої Любові „Ідентифікація генів, залучених в регуляцію алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантних штамів *Saccharomyces cerevisiae*” – завершена наукова праця, в якій вперше висвітлено зв’язок пероксисом і низки регуляторних генів з ферmentацією ксилози дріжджами роду *Saccharomyces*. За структурою та змістом, актуальністю, новизною, практичним значенням, ступенем

достовірності та обґрунтованості результатів та повнотою їхнього викладення у публікаціях, вищезазначена дисертація повністю відповідає вимогам пп. 9, 10, 11 і 12 „Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 №167, а її автор, Дзанаєва Любов Сергіївна, 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

Б.О. Осташ

12 квітня 2021 р.

Підпис Б.О. Осташа засвідчує:
вчений секретар ЛНУ імені І. Франка, доц.

О.С. Грабовецька

