

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Дзанаєвої Любові Сергіївни «Ідентифікація генів, залучених в
регуляцію алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантних штамів
Saccharomyces cerevisiae», подану на здобуття наукового ступеня
доктора філософії за спеціальністю 091 «біологія»

Актуальність дисертації. В останні десятиріччя значні зусилля науковців усього світу привертає проблема отримання альтернативних джерел енергії, які могли б замінити традиційні палива, використання яких призводить до негативного впливу на кліматичні умови та росту концентрації парникових газів в атмосфері. Одним з таких перспективних палив є етанол, який в промислових масштабах отримують шляхом ферментації цукрових та крохмалевмісних субстратів з використанням дріжджів, так званий етанол першого покоління. Однак така сировина може також використовуватися в харчовій промисловості та тваринництві. Перспективним для отримання біоетанолу може стати використання такої дешевої та поновлювальної сировини, як лігноцелюлоза. Проблематичність ефективної конверсії цього субстрату до етанолу полягає в складності гідролізу цього полімеру, який включає лігнін, геміцелюлозу та целюлозу, а також нездатності переважної більшості дріжджів ферментувати пентози, які в значних кількостях містяться в гідролізатах лігноцелюлозних субстратів. Одним з підходів вирішення цієї проблеми є генетична модифікація дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, природні штами яких не здатні до асиміляції та ферментації пентозних цукрів, зокрема ксилози. Незважаючи на активні роботи в цьому напрямку, отримані за допомогою методів метаболічної інженерії та лабораторної еволюції штами сахароміцет все одно характеризуються доволі невисокою ефективністю ферментації ксилози. Отже, отримання ефективних продуцентів етанолу з

лігноцелюлозної сировини з використанням дріжджів *S. cerevisiae* є актуальною та важливою проблемою.

Дисертаційна робота Дзанаєвої Любові Сергіївни присвячена пошуку потенційних генів-мішеней, залучених в регуляцію ферментації ксилози рекомбінантним штамом дріжджів *S. cerevisiae* та визначенню ролі пероксисом в цьому процесі. Роль пероксисом та пероксисомних ферментів в клітинах *S. cerevisiae* в зброджуванні ксилози взагалі не досліджена. Також в роботі досліджено вплив низки генів, що кодують транскрипційні фактори, на ферментацію ксилози та глюкози, шляхом створення штамів з делеціями та підвищеною експресією відповідних генів. Тому тема дисертації Дзанаєвої Л.С. безперечно є актуальною як в теоретичному, так і в практичному аспекті.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційна робота Дзанаєвої Л.С. була виконана в рамках фундаментальних досліджень Інституту біології клітини НАН України за темою «Роль транскрипційних активаторів та репресорів в регуляції алкогольної ферментації пентоз та гексоз» (№ держреєстрації 0120U456789, 2020-2021 рр.), а також в рамках гранту Польського національного наукового центру (NCN) Opus UMO-2016/21/B/NZ1/00280 та грантів Національної академії наук України (гранти 2-19 і 31-19).

Наукова новизна досліджень. В результаті проведених досліджень вперше встановлено вплив пероксисом на процес ферментації ксилози рекомбінантним штамом дріжджів *S. cerevisiae*, а саме, що дефіцит пероксисом в цьому штамі призводить до зниження продукування етанолу з ксилози. Вперше показана роль пероксисомної каталази *Cta1* в процесі ферментації ксилози, в результаті делеції гену *CTA1* знижувалося нагромадження біомаси та продукування етанолу. Також вперше визначено роль низки транскрипційних факторів на процес ферментації ксилози та глюкози рекомбінантним штамом дріжджів *S. cerevisiae*. Встановлено, що делеція гену *HAP4* в рекомбінантному штамі *S. cerevisiae* GS010 призводить до підвищення продукування етанолу з ксилози в 1,8 рази у порівнянні з вихідним штамом.

Практичне значення результатів досліджень. На основі штаму дріжджів *S. cerevisiae* GS010, здатного до засвоєння ксилози, створено колекцію рекомбінантних штамів з делеціями та підвищеною експресією генів *ADR1*, *CAT8*, *ASG1*, *HAP4*, *SIP4*, *TUP1* та *ZNF1*. Визначено потенційні гени-мішені для подальшого підвищення ефективності продукування етанолу з ксилози шляхом метаболічної інженерії. Отриманий рекомбінантний штам *S. cerevisiae* з делецією гену *HAP4*, з підвищеним в 1,8 рази продукуванням етанолу з ксилози, який може бути перспективним як вихідний штам для подальшого підвищення ефективності ферментації ксилози. Отримані дані щодо генів-мішеней та ролі пероксисом в процесі ферментації ксилози можуть використовуватися для метаболічної інженерії інших штамів та видів дріжджів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертаційна робота Дзанаєвої Л.С. є цілісним дослідженням, мета та завдання сформульовані чітко та логічно. Висновки дисертаційної роботи базуються на результатах проведених досліджень та зроблені відповідно до мети та поставлених завдань дисертаційної роботи. Обґрунтованість та достовірність положень та висновків в дисертаційній роботі підтверджуються значною кількістю експериментального матеріалу, отриманого в результаті досліджень з залученням широкого спектру класичних та сучасних генетичних, мікробіологічних, біохімічних та мікроскопічних методів. Статистична обробка даних, отриманих в результаті досліджень, які проводили як три незалежні експерименти з трьома експериментальними паралелями, дозволяє зробити висновок про достовірність положень та висновків, зроблених дисертанткою.

Отже, результати досліджень, представлені в дисертаційній роботі Дзанаєвої Л.С., та сформульовані на їх підставі положення та висновки слід вважати обґрунтованими та достовірними.

Повнота викладу основних результатів дисертаційної роботи в наукових фахових виданнях. Результати досліджень, наведені в дисертаційній роботі, досить повно відображені в 9 наукових публікаціях.

Дисертанткою у співавторстві за темою дисертаційної роботи опубліковано 3 статті у фахових наукових журналах, у тому числі 2 – в журналах, що включені до наукометричних баз Scopus та Web of Science, а також 6 тез доповідей. Основні результати досліджень представлено у формі усних або стендових доповідей на наукових конференціях та з'їздах.

Структура та обсяг дисертації. За обсягом та структурою дисертація Дзанаєвої Л.С. відповідає вимогам МОН України. Дисертаційна робота викладена на 159 сторінках друкованого тексту і складається з наступних розділів: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів», «Висновки», додатку та переліку посилань. Робота містить 50 рисунків та 7 таблиць. Список використаної літератури містить 243 джерела.

Зміст анотації відповідає основним положенням дисертаційної роботи.

Дискусійні положення та зауваження до дисертаційної роботи

Оцінюючи дисертаційну роботу Дзанаєвої Л.С. в цілому високо та позитивно, хотілося б звернути увагу дисертантки на деякі недоліки в роботі і висловити певні побажання.

1. Бажано було б описати функції генів *ADRI*, *CAT8*, *SIP4*, *CTAI* та *ZNF1* та продуктів цих генів в огляді літератури. Ця інформація чомусь переважно надається в розділі «Результати досліджень та їх обговорення».

2. В розділі «Матеріали і методи досліджень» в середовище YNB з ксилозою – за специфікацією виробника Yeast Nitrogen Base додають в кількості 6,7 г/л, а в дисертаційній роботі вказується 1,7 г/л. Це помилка чи така концентрація в середовищі якось обумовлена?

3. В Таблиці 3.1 вказується концентрація активних форм кисню (АФК) на 36 годину культивування, а в тексті – на 62 годину. Який саме час є вірним і чому АФК виміряли саме в такому часовому проміжку?

4. Чи можна стверджувати, що «рівень накопичення біомаси PEX34/GFP був помірно збільшеним при аеробному культивуванні на ксилозі»

(Рис. 3.10), якщо різниця в нагромадженні біомаси між двома штамми, якщо судити по рисунку, в межах похибки?

5. Дані, представлені на рисунку 3.30 (А), не демонструють чітко «обмеження приросту біомаси» штаму SIP4 у порівнянні з GS010, як відзначається в дисертаційній роботі на сторінці 99.

6. Деякі твердження в дисертаційній роботі не підкріплюються відповідними посиланнями, наприклад про перспективність дріжджів *Ogataea polymorpha* та *Spathaspora passalidarum* на сторінці 120, про «37 генів, відповідальних за біогенез пероксисом» на сторінці 121, про роль пероксисом в ферментації ксилози у дріжджів *O. polymorpha* на сторінці 122.

7. Висновок на сторінці 121 щодо необхідності пероксисомної каталази Ctal для ефективного росту рекомбінатного штаму сахароміцет на ксилозі є не зовсім коректний, оскільки не спостерігали значного пригнічення нагромадження біомаси при рості на ксилозі мутанту *ctalΔ* в умовах обмеження кисню (Рис.3.8).

Також виникли декілька питань до автора дисертаційної роботи:

1. Збільшення генерування активних форм кисню (АФК) на ксилозі в дисертаційній роботі пояснюється токсичним ефектом ксилози (стор.70). Чи спостерігали зниження нагромадження біомаси або подовження лаг-фази при рості на ксилозі у порівнянні з ростом на глюкозі?

2. Чим можна пояснити зниження нагромадження біомаси при культивуванні на ксилозі мутанту *tup1Δ* в 4 рази в аеробних умовах, але лише в 1,2 рази в умовах обмеження кисню у порівнянні з вихідним штамом?

Наведені зауваження і запитання жодним чином не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Отримані дисертанткою рекомбінантні штами ксилзоферментуючих дріжджів можуть бути використані для створення ефективних продуцентів етанолу 2-го покоління з лігноцелюлози.

Висновок про відповідність дисертації вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника.

Дисертаційна робота «Ідентифікація генів, залучених в регуляцію алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантних штамів *Saccharomyces cerevisiae*» є завершеною науковою працею та за своєю актуальністю, науковою новизною, достовірністю, практичним та теоретичним значенням отриманих результатів, обґрунтованістю сформульованих положень та висновків, кількістю опублікованих наукових робіт, 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), а її автор, Дзанаєва Любов Сергіївна, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «біологія».

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
відділу фізіології промислових мікроорганізмів
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАНУ

Янева О.Д.

26 квітня 2021 року

Підпис Янева
засвідчено
ученим секретарем к.

