

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, головного наукового співробітника Осташа Богдана Омеляновича на дисертаційну роботу Андрєєвої Юлії Андріївни

на тему: «Механізми дії нових регуляторних факторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів», представленої на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність дисертації. Рибофлавін (відомий також як вітамін В₂) – промислово важлива природна сполука, що виробляється за допомогою мікробного синтезу у масштабі тисяч тон. Рибофлавін важливий як медичний препарат і як кормова добавка, також як кольорант у низці напоїв. Враховуючи масштаб виробництва цієї сполуки, навіть кількавідсоткове підвищення рівня її продукції мікробами матиме чималий економічний ефект. Цікавими є також питання природної появи, еволюції та генетичної регуляції метаболічних шляхів синтезу цього вітаміну. Їхнє розуміння сприятиме спробам метаболічної інженерії надпродуцентів цієї та споріднених сполук. Отже, дисертаційна робота Андрєєвої Ю.А. – актуальна, має важливе теоретичне та практичне значення.

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 темами: «Генетичний контроль біосинтезу та транспорту рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (№ держ. реєстрації 0115U001362, 2015 – 1019); «Генетичні та біохімічні аспекти регуляції деяких катаболічних та анаболічних процесів у мікроорганізмів: алкогольної ферментації, катаболізму метанолу, біосинтезу флавінів, гліцерину, водню та глутатіону»; «Вивчення механізму дії нових генів в регуляції синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Candida famata*»; «Ідентифікація та з'ясування ролі нових структурних та регуляторних генів у надсинтезі рибофлавіну у флавіногенних дріжджів». Частина експериментальної роботи виконана у межах досліджень за грантом Польського національного наукового центру, Opus UMO-2018/29/B/NZ1/01-497 – «Regulatory mechanism involved in riboflavin overproduction in the flavinogenic yeast *Candida famata*». Авторка дисертаційної роботи є однією із виконавиць вищезгаданих науково-дослідних тем.

Наукова новизна дослідження. Вперше для флавіногенних дріжджів *Candida famata* застосовано методи метаболічної інженерії для підвищення продукції рибофлавіну за рахунок генетичних маніпуляцій окремими генами регуляції біосинтезу цієї сполуки, а також генами транспорту та пентозофосфатного шляху. Також вперше досліджена локалізація білка екскретази вітаміну В₂ у клітинах дріжджів *C. famata*.

Практичне значення отриманих результатів. Здобувачкою ідентифіковано нові мішені для метаболічної інженерії рекомбінантних штамів

S. famata, що дасть змогу сконструювати стабільні надпродуценти рибофлавіну.

Ступінь обґрунтованості та достовірність висновків та результатів.

Дисертація є цілісним дослідженням, її мета і завдання сформульовані чітко і змістовно. Андреева Ю.А. 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 відображено у публікаціях. Зокрема, за темою дисертації опубліковано 3 статті, всі у виданнях, що входять до наукометричної бази Scopus і мають імпаکت-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, висновків, списку використаних джерел, що налічує 193 статті, та трьох додатків. Роботу викладено на 133 сторінках друкованого тексту, що містить 20 рисунків і вісім 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 підсумовано усю наявну інформацію про флавіногенез та його регуляцію у різних форм життя. У другому розділі викладено матеріали і методи досліджень. У третьому розділі описано результати досліджень. Спочатку дисертантка дослідила вплив гена вакуолярної АТФази VMA1 і транскрипційного фактора *SEF1* на рівень продукції рибофлавіну у *S. famata*. Далі Андреева Ю.А. дослідила вплив окремих генів пентозофосфатного шляху на продукцію рибофлавіну. Насамкінець, дисертантка висвітлила внутрішньоклітинну локалізацію білка-екскретази рибофлавіну Rfe1. У четвертому розділі – узагальнення отриманих результатів.

Зауваження щодо дисертації:

1. В огляді літератури описано низку біохімічних трансформацій, але є вкрай мало ілюстрацій (лише дві – структурі формули рибофлавіну та похідних сполук, та загальну схему флавіногенезу). На мою думку, повнішому розумінню цієї інформації сприяли б зображення цих метаболічних шляхів, з наведенням хімічних формул, а не лише аббревіатур.
2. 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?

3. Рис. 3.5 (стор. 68) зображує дендрограму амінокислотних послідовностей, отриманих в результаті пошуку локальних хітів до заданого білка програмою BLASTP. З опису цього рисунка методу складно зрозуміти, чи є у масиві послідовності аутгруп (outgroup) – послідовність, що є таксономічно та філогенетично віддалена від решти, яка дає змогу коректно розташувати корінь дерева. Алгоритмічна надбудова BLAST Tree View не генерує філогенетичне дерево у повному значенні цього терміну, це distance tree (дерево відстаней, або дерево-провідник). Незрозуміло, котрі з виявлених послідовностей походять з флавіногенних, котрі – з нефлавіногенних дріжджів. Цю інформацію можна було б схематично навести праворуч від дендрограми, що значно полегшило б розуміння висновків здобувачки. В такому вигляді дані, як вони наведені в дисертації, не дають змоги погодитися з твердженням про ближчу спорідненість певних білків у масиві – див. також наступне зауваження.
4. Далі в описі (стор. 68) дисертантка пише про “...певний рівень гомології”. Гомологія – це припущення про спільне еволюційне минуле певних об’єктів (тут – амінокислотних послідовностей), і не може мати ступенів чи рівнів порівняння. Натомість, здобувачка пише про рівні ідентичності послідовностей (кількісний показник), які можуть бути більшими чи меншими, і на основі яких можна висувати припущення про гомологію (якісний показник). Втім, якщо усі знайдені послідовності у попарних вирівнюваннях мали число очікування E менше 0,05 – то для жодної з них відкинути припущення про гомологію не можна. Тут варто лише зазначити, що певні послідовності подібніші між собою, ніж з іншими.
5. Вивчення різних промоторів з ортологічної групи *SEF1*, стор. 73-75. Вивчення цього гена займає важливе місце в дисертації, і повнішого розуміння результатів можна було б досягти при докладнішому описі що відомо і що власне зроблено. Доречною в огляді літератури була б інформація про операторну послідовність цього транскрипційного фактора (чи згадка про відсутність таких даних); подібність/відмінність структури доменів “цинкові пальці” у цій групі ортологів, промотори генів яких досліджували; в результатах і обговоренні – розміри клонованих промоторів і дані про авторегуляторні властивості *Sef1*.

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

Загальний висновок. Дисертаційна робота Андрєєвої Юлії Андріївни «Механізми дії нових регуляторних факторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» – завершена наукова праця, в якій ідентифіковано та з’ясовано закономірності дії низки чинників, залучених у регуляцію біосинтезу рибофлавіну у дріжджів *S. famata*. За структурою та змістом, актуальністю, новизною, практичним значенням, ступенем достовірності та обґрунтованості результатів та повнотою їхнього викладення у публікаціях, вищезазначена

дисертація повністю відповідає вимогам наказу МОН України №40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а також вимогам «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 №44, а її автор, Андрєєва Юлія Андріївна, 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
1 вересня 2022 р.



Богдан ОСТАШ

Підпис Богдана Осташа засвідчує
вчений секретар ЛНУ імені І. Франка, доц.



Ольга ГРАБОВЕЦЬКА