ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка Міністерства освіти і науки України Ющука Олександра Сергійовича на дисертаційну роботу Радченко Марини Михайлівни: «Отримання штаму-продуценту *Bacillus subtilis* з підвищеним накопиченням рибофлавіну», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія», за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність роботи. Рибофлавін (або вітамін B_2) є важливим компонентом дієти: цей вітамін життєво-важливий для формування двох основних коензимів, а саме флавін мононуклеотиду і флавін аденін динуклеотиду. Ці коензими задіяні в енергетичному метаболізмі, клітинному диханні та продукції антитіл, а також необхідні для нормального росту і розвитку хребетних. Не менш важливим є і те, що згадані коензими необхідні для метаболізму інших вітамінів, зокрема ніацину, вітаміну B_6 і фолієвої кислоти. Природні джерела рибофлавіну включають м'ясо, рибу, яйця і молочні продукти, рослинні продукти (зокрема мигдаль), а також гриби. Будучи водорозчинним вітаміном, рибофлавін не накопичується в організмі, а отже його відсутність (або недостатня присутність) в дієте легко призводить до серйозних дефіцитних станів. Рибофлавін застосовується для терапії потоншення рогівки; існують дані, що цей вітамін може бути ефективним для лікування мігрені. В країнах Європи цей вітамін також застосовують як харчовий барвник (Е101).

Біосинтез вітаміну B_2 відбувається в клітинах бактерій, рослин і грибів, але не в клітинах тварин. Біосинтетичними попередниками рибофлавіну є рибулозо-5-фосфат і гуанозин трифосфат, що перетворюються в каскаді доволі універсальних біохімічних реакцій. Хоча історично рибофлавін спершу одержували в процесі хімічного синтезу, це виявилося нерентабельним. Сьогодні промисловий синтез рибофлавіну здійснюється із використанням таких нижчих грибів, як штами *Ashbya gossypii*, *Candida famata* і *Candida flaveri*, Грам-позитивних бактерій *Corynebacterium* spp. і *Bacillus subtilis*. Особливо важливим джерелом рибофлавіну є ферментація саме штамів *B. subtilis* – за деякими оцінками, саме у такий спосіб отримують понад 4000 т рибофлавіну на рік.

Оцінюючи незамінність рибофлавіну в різних аспектах людської життєдіяльності, перспективним виглядає масштабування продукції цього вітаміну в біотехнологічній промисловості України. Відповідно, робота Марини Радченко, в якій здійснюється пошук альтернативних продуцентів рибофлавіну, а також селекція їх для надпродукції цього вітаміну, беззаперечно є актуальною і відповідає сучасним викликам.

Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами. Дисертаційна робота Марини Радченко виконувалася в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» НАН України в рамках відомчої тематики лабораторії промислової та харчової біотехнології «Створення штамів-надпродуцентів вторинних метаболітів (амінокислот, спиртів, вітамінів)» (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U101489).

Повнота викладу основних результатів роботи в наукових фахових виданнях. За матеріалами дисертації опубліковано 13 робіт, в тому числі: 4 статті у наукових фахових виданнях України; 1 стаття у журналі із імпакт-фактором, що входить до наукометричної бази даних Scopus (Q3 Scimago 2021 – cellular biology); 8 тез доповідей наукових конференцій. Робота була апробована на великій кількості міжнародних і вітчизняних конференцій. Кількість і якість публікацій відповідають «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії».

Аналіз структури дисертації. Дисертаційна робота Марини Радченко має типову структуру і складається із: вступу; Розділу 1, в якому подано огляд літератури за тематикою дисертації; Розділу 2, в якому описано матеріали і методи досліджень; Розділів 3-7, в яких подано результати досліджень; Розділу 8, в якому здійснено узагальнення отриманих результатів; висновків; списку використаної літератури; чотирьох додатків. До складу дисертації також входить Анотація українською і англійською мовами, в яких дається коротке резюме бекграунду роботи, основних результатів і їх інтерпретації. Дисертацію викладено на 151 сторінці машинописного тексту, до її складу входить 39 рисунків і 13 таблиць. Список літературних джерел складає 157 робіт.

У **Вступі** Марина Радченко дає коротку характеристику роботи – описує сучасний стан проблеми, робить обґрунтування актуальності теми, надає інформацію про зв'язок даної роботи з науковими програмами, дає визначення меті, завданню, об'єкту і предмету роботи, аргументує наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, дає характеристику висвітленню результатів роботи у публікаціях, описує структуру роботи.

У **Розділі 1** авторка робить огляд літератури, присвяченій рибофлавіну. Зокрема, авторка описує структурні особливості цього вітаміну, історію вивчення, основні способи одержання рибофлавіну. Дає характеристику біотехнологічним продуцентам рибофлавіну. Описує шлях біосинтезу рибофлавіну у бактерій. Характеризує структуру рибофлавінового оперона *B. subtilis* і особливості його функціонування. Також, авторка характеризує підходи до створення надпродуцентів рибофлавіну на основі штамів *B. subtilis* із використанням геномних і генно-інженерних підходів.

Закінчує огляд літератури опис підходів до промислового виробництва рибофлавіну, а також методів довготривалого зберігання культур бактерій, зокрема за допомогою ліофілізації.

У **Розділі 2** Марина Радченко описує методи, застосовані в роботі. Зокрема, це детальна інформація про умови культивування і поживні середовища для вирощування бактерій; методи філогенетичного аналізу; методи дослідження фізіологічних та біохімічних властивостей *B. subtilis*; підходи УФ і хімічного мутагенезу; особливості культивування у біореакторі.

У **Розділі 3** авторка описує процес виділення ізолятів бактерій, отриманих із поверхні бульб картоплі, заради пошуку мікроорганізмів, здатних продукувати рибофлавін. Як результат, авторка виводить у чисту культуру штам *B. subtilis*, задепонований як ІМВ В-7797, здатний до накопичення рибофлавіну. Здійснюється морфологічна, мікроскопічна, фізіолого-біохімічна характеристика штаму. Продемонстровано також секвенування фрагментів гена 16S рРНК ІМВ В-7797, і порівняння цієї послідовності із послідовностями генів 16S рРНК, доступними в базі даних GenBank. Нарешті, оптимізована процедура ліофілізації ІМВ В-7797.

У **Розділі 4** дисертантка проводить систематичний аналіз здатності ІМВ В-7797 до продукції рибофлавіну. Зокрема, вивчається динаміка накопичення рибофлавіну і вплив на рівень продукції і накопичення біомаси кількості прекультури; складу поживних середовищ, зокрема джерел вуглецю; вплив різних значень pH. Отримані у цьому розділі результати дозволяють створити найбільш оптимальний протокол ферментування ІМВ В-7797 з метою продукції рибофлавіну, який застосовується в подальшій роботі.

У **Розділах 5** і **6** авторка зосереджується на описі роботи по створенню УФ- і NTG-індукованих мутантів ІМВ В-7797. Передумовою до мутагенезу служить вивчення чутливості клітин ІМВ В-7797 до УФ випромінювання і NTG, завдяки чому авторка змогла отримати мутантів, які продукували більше рибофлавіну, ніж вихідних штам, але не мали суттєвого погіршення накопичення біомаси. NTG-індукований мутагенез було застосовано і до отриманих УФ-індукованих мутантів, ще більше підвищуючи їх продуктивність.

Розділ 7 дисертаційної роботи присвячено відпрацюванню процесу ферментації мутанта, отриманого за допомогою УФ, у 10 *л* ферментері. Відомо, що продукція різних метаболітів бактерій за умов культивування в колбах Ерленмеєра може значно відрізнятися від продукції за умов культивування в ферментерах, тому отримані в Розділі 7 результати важливі для подальшого індустріального масштабування продукції рибофлавіну отриманим штамом.

У **Розділі 8** Марина Радченко здійснює підсумовування і обговорення отриманих результатів.

Вцілому, в роботі продемонстровано повний цикл створення нового продуцента рибофлавіну, починаючи від виділення природного ізоляту, характеристики його властивостей, підбору оптимальних умов культивування, і, нарешті, створення мутантів із підвищеною продукцією вітаміну. Цілісність концептуального задуму, а також послідовність і повнота вивчення всіх аспектів циклу складають дуже позитивне враження.

Оцінка обґрунтованості і достовірності наукових положень та висновків сформульованих у дисертації. Наукові положення, висновки, сформульовані дисертанткою, є достовірними та обґрунтованими. Дисертація Марини Радченко є завершеною науковою працею, яка містить всі необхідні структурні елементи, такі як: вступ, огляд літератури, матеріали і методи, результати і висновки. Мета і завдання дослідження обґрунтовані, а виконання завдань здійснюється в послідовній і логічній манері. Отримані результати проаналізовано і узагальнено. Висновки відповідають поставленим завданням, а також отриманим результатам, є обґрунтованими і достовірними. Для виконання роботи використано загальноприйняті методи і підходи мікробіології та біотехнології.

Наукова новизна одержаних результатів. Авторкою виділено новий штам-продуцента рибофлавіну – IMB B-7797 – який належить до виду *B. subtilis*, що підтверджено описом його морфологічних і біохімічних властивостей, а також частковим секвенуванням гена 16S рРНК (фрагменти якого депоновані у базі даних GenBank з ідентифікаційними номерами MK880455 і MK880456). За допомогою хімічного і УФ мутагенезу дисертантка отримала мутанти із збільшеною продукцією рибофлавіну. Нарешті, створено повний протокол із ферментування IMB B-7797, а також його похідних, як на рівні колб Ерленмеєра, так і на рівні 10 *л* ферментера.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати мають важливе практичне значення. Отримано новий штам-продуцент рибофлавіну, а також два його похідні із збільшеною продукцією вітаміну; ці штами було задепоновано в «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для сільськогосподарської та промислової біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», а вихідний ізолят – в «Національному Депозитарії мікроорганізмів» Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Найвищий рівень продукції рибофлавіну, який досягнуто в роботі, становив майже 20 г/*л*, що є на рівні промислових продуцентів, описаних в літературі. Фактично, штами, а також протокол ферментації, готові до промислового застосування.

Відсутність порушень академічної доброчесності. Дисертаційна робота Марини Радченко не містить явних порушень академічної доброчесності.

Відповідність теми дисетації профілю спеціальності. Дисертаційна робота Марини Радченко відповідає стандарту галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Запитання до автора в межах наукової дискусії:

1. Чому для штамів *B. subtilis* характерне значне накопичення рибофлавіну? Які селективні переваги дає це бактеріям?

2. Авторка описує плівку, яка з'являлася на поверхні культур ізолятів, які вирощувалися в рідкому середовищі. Не зрозуміло, чи ці культури вирощували за умов струшування чи ні? Якщо ні, то чому? Яка фізіологічна роль такої плівки і чому вона утворюється?

3. При морфологічній характеристиці отриманих ізолятів авторка згадує, що: «Бактерії за механізмом рухливості поділяють на дві групи: ті, що «повзають», і ті, що «плавають». Хотілося би, щоб дисертантка навела приклади бактерій, «які повзають». Чи дійсно рух таких бактерій забезпечується «завдяки хвилеподібним скороченням клітини», як згадує в роботі дисертантка?

4. На Рис.3.7. видно клітини паличкоподібної форма, але не помітно джгутиків. На практиці, для візуалізації джгутиків потрібна фазова-контрастна мікроскопія; їх неможливо помітити за допомогою просвітної мікроскопії. Чому авторка стверджує, що за цим рисунком можна оцінити морфологію джгутиків?

5. Із Таблиці 3.3., а також основного тексту дисертації, випливає, що ізолят IMB B-7797 чутливий до левоміцетину, але стійкий до хлорамфеніколу. Проблема полягає в тому, що левоміцетин і хлорамфенікол – це один і той же антибіотик. Левоміцетин є назвою хлорамфеніколу, прийнятою в СРСР. Як це може прокоментувати авторка?

6. Авторка стверджує, що виділення ДНК IMB B-7797 проводили за допомогою загальноприйнятих методів. Проте, існує дуже багато таких «загальноприйнятих методів», кожен із яких має свої особливості. Як конкретно виділяли ДНК із IMB B-7797?

7. Дисертанткою не просеквеновано повну послідовність гена 16S рРНК ізолята IMB B-7797. Порівняння отриманих фрагментів із доступною послідовністю гена 16S рРНК *B. subtilis* IAM 12118 16S (NR_112116) дає змогу стверджувати, що прибл. 200 п.н. гена залишилися непросеквенованими. Відповідно, володіючи неповною послідовністю гена не можна категорично заявляти, що він найбільш подібний до NR_112116. Чи може авторка описати, як саме здійснювали порівняння отриманих послідовностей із наявними, і як отримали висновок, що вони найбільш схожі до гена 16S рРНК *B. subtilis* IAM 12118 16S?

8. На Рис. 3.9 зображена «Дендрограма генетичної подібності між штамом *B. subtilis* IFBG MK-2 та типовими штамами роду Bacillus IAM 12118». Як здійснювали реконструкцію, враховуючи, що отримані послідовності не покривають прибл. 200 п.н.

гена 16S рРНК? Яке обґрунтування вибірці послідовностей в дендрограмі? Що означає планка масштабу під дендрограмою?

8. Чи графік на Рис. 5.1 сканований?

9. Що дає нам підстави вважати, що включення на Рис. 5.2 є кристалами рибофлавіну?

10. У легендах до рисунків не пояснено, що означають планки похибок. Що означає * – p<0,05 у підписах до графіків?

Зауваження до дисертаційної роботи. В цілому, дисертаційна робота Марини Радченко складає позитивне враження стосовно концептуального задуму і його виконання. Однак, в ході аналізу роботи виникла низка зауважень:

1. В роботі трапляються помилки і недоліки форматування. Їх можна поділити на такі класи:

- помилки в узгодженні граматики речень, напр.: Ст. 72 «В багатьох зразках було виявлено суміші культур, які надалі для виділення чистих культур мікроорганізмів, що продукували рибофлавін, було проведено розсіювання методом граничних розведень»; Ст. 78 «Виявлено чітко окреслені спори (рис. 3.6.), забарвлені блакитним або синім кольором, а цитоплазма молодих клітин, забарвлена рожевим або червоним».

- пропущені пробіли між словами, напр.: Ст. 74 «Процес культивуванняздійснювали протягом…»; Ст. 75 «Кількість рибофлавіну в культуральній рідинівизначали…».

- друкарські помилки, напр. Ст. 19 «академіі», Ст. 78 «Ст. 78 «грамп-озитивних».

- розриви назв розділів із початками розділів, напр. Ст. 59, Ст. 69.

- залишки редакторських правок, напр. Ст. 96 «У сукупності, отримані дані засвідчують, що синтез рибофлавіну ким? можна підвищити у більше ніж 2 рази»; Ст. 122 «Отримані послідовності задепоновано в базі даних GenBank під номерами … і …».

2. На мікрофотографіях не наведено планок масштабу, які би дозволили недвозначно стверджувати про розмір об'єктів у полі зору.

3. У роботі не вистачає схеми генеалогії всіх згаданих штамів, відсутність якої заплутує читача.

4. У Розділі 8 не вистачає схем, які би узагальнювали отримані результати, і допомагали читачеві розуміти обговорення.

5. Фотографії висновку, паспорта і свідоцтва в додатках Б-Д виглядають неохайними. Все-таки, вартувало би надати версії, зроблені за допомогою сканера документів.

Висновок. Дисертаційна робота Марини Радченко є цілісним, актуальним, самостійним і оригінальним науковим дослідженням, що базується великому масиві експериментальних даних. Основні положення і висновки є обґрунтованими і

достовірними. Робота відповідає вимогам «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» затвердженого Постановою Кабінету міністрів України № 40 від 12.01.2017 р., Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії (Постанова Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44). Здобувачка Радченко Марина Михайлівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник кафедри генетики і біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка **Олександр ЮЩУК**