ВІДГУК
офіційного рецензента на дисертаційну роботу
Гоцуляка Віталія Ярославовича
«Порівняльний аналіз застосування ліпаз для отримання біодизелю з рижію та абіссинської гірчиці», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність обраної теми. З огляду на загальносвітову тенденцію щодо зростання попиту на відновлювані енергоносії, тема дисертаційної роботи є безумовно актуальною. Використання рослинної сировини для продукції біодизеля є перспективною «зеленою» технологією, оскільки така сировина є доступним та потенційно відновлюваним ресурсом, і, крім того, рослинні олії мають оптимальний жирнокислотний склад, що визначає якість біодизеля.

Наразі існує доволі широкий вибір олійних культур – соя, соняшник, олійна пальма, тощо. Однак існує проблема конкуренції між технічним та харчовим використанням олійних культур, а також придатності до вирощування у різних кліматичних зонах. Перспективними олійними культурами є представники родини Brassicaceae, зокрема, *Brassica carinata* та *Camelina sativa*, які характеризуються високою агрономічною пластичністю, придатністю до вирощування на різних грунтах та у різних кліматичних зонах, сприятливим жирнокислотним складом олії та можливістю використання у сівозмінах.

Все вищезазначене підкреслює актуальність дослідження різних аспектів, пов’язаних із використанням олій *C. sativa* та *B. carinata* як сировини для отримання біодизеля, зокрема, особливостей жирнокислотного складу олій різних ліній зазначених культур, а також генетичних чинників, що впливають на жирнокислотний профіль даних культур.

Крім того, актуальність даної роботи зумовлена розробкою стратегії ефективного використання комерційних ліпаз грибного походження для трансестерифікації олій *C. sativa* та *B. carinata* як альтернативи традиційному

методу лужної FAME/FAEE конверсії жирних кислот. У порівнянні із лужним каталізом, який має певні недоліки, такі як утворення мила, чутливість до вмісту води та вільних жирних кислот, потреби в очищенні кінцевого продукту, трансестерифікація за використання комерційних ліпаз є більш привабливою та екологічною альтернативою, оскільки реакція відбувається за м'якших умов та не вимагає спеціальної попередньої підготовки сировини, адже ліпази здатні каталізувати як трансестерифікацію триацилгліцеролів, так і естерифікацію вільних жирних кислот. Така стратегія сприятиме впровадженню технологічно гнучких, економічно обгрунтованих та екологічно безпечних «зелених» методів виробництва біопалива із залученням відновлюваних природних ресурсів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках науково-дослідних робіт відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (м. Київ). Роботу виконано в рамках держбюджетних тематик: науково-дослідного проєкту ДО «ВЦП КНУ ім. Т. Шевченка при НАН України» «Розробка технологічних засад отримання біодизелю з олії карінати (*Brassica carinata*) шляхом ліпазної трансестерифікації» (2024-25 рр., № Держреєстрації: 0124U002185); проєкту НАН України «Економічно важливі олійні культури для покращення продовольчої і біологічної безпеки держави та створення нових лікарських препаратів» (2023-2024 рр., № Держреєстрації: 0123U102104) у рамках програми 6541230; цільової комплексної науково-технічної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (2018-2022 рр.)

Ступінь обґрунтованості та достовірності. Структура дисертаційної роботи та отримані результати цілком відповідають поставленій меті – обґрунтуванню перспектив використання *C. sativa* та *B. carinata* як олійної сировини для виробництва біодизелю шляхом ліпазної трансестерифікації. Для виконання даної мети та завдань використано комплекс сучасних

біоінформатичних, порівняльно-геномних, біохімічних, аналітичних і статистичних методів, які детально описані у розділі Матеріали і методи. В результаті виконання роботи було сформульовано не лише висновки щодо жирнокислотного профілю *C. sativa* та *B. carinata* та можливих механізмів його покращення біотехнологічними методами або за використання маркер-опоередкованої селекції, але й алгоритм отримання біодизелю на їх основі, який включав такі етапи: 1) прогнозування придатності рослинних культур для отримання олійної сировини на основі визначення рівнів експресії генів ліпідного метаболізму, 2) біохімічного аналізу жирнокислотного складу рослинної олії, 3) підбору комерційних ліпаз для ефективної етанольної або метанольної конверсії олій цільових видів рослин. Грамотне використання комплексу аналітичних методів та статистичних критеріїв підтверджують високу достовірність отриманих теоретичних та практичних результатів.

Наукова новизна. Наукова новизна одержаних результатів є беззаперечною. Основним критерієм, що визначає наукову новизну, є комплексне поєднання результатів дослідження у єдину логічну схему у відповідності до основної мети роботи – дослідження перспектив використання *C. sativa* та *B. carinata* як джерела олійної сировини для отримання біодизелю за використання ферментативного каталізу.

Зокрема, у роботі вперше ідентифіковано та охарактеризовано основні гени *C. sativa* та *B. carinata* (*DGAT1, DGAT2, LPAT2, WRI1, FAD2, FAD3, FAE1*), залучені у біохімічних каскадах синтезу жирних кислот. Було вперше детально досліджено структурно-функціональну організацію цих генів, їх філогенетичні зв'язки, копійність, експресійну активність, регуляторні ділянки. Було вперше виявлено та описано SSR-ділянки в інтронах та регуляторних ділянках генів біосинтезу ліпідів *B. carinata* та запропоновано молекулярно-генетичні маркерні системи на їх основі.

Крім того, у роботі було вперше детально досліджено ліпідний профіль насіння представників родини *Camelina,* зокрема, *C. sativa* та споріднених диких видів (*C. laxa, C. neglecta, C. assylum, C. rumelica, C. macrocarpa, C. hispida*), а також

селекційних ліній *B. carinata.* Автором було оцінено показники елонгації та десатурації для обраних генотипів, які характеризують спрямування метаболічних шляхів біосинтезу ліпідів у напрямку більш високого вмісту поліненачисених або мононенасичених довголанцюгових жирних кислот. Таким чином, у даній роботі було не лише охарактеризовано гени біосинтезу жирних кислот, але й досліджено їх потенційний вплив на формування ліпідного профілю цільових культур.

Більше того, у дисертації було вперше ідентифіковано гени ендогенних ТАГ-ліпаз *C. sativa* та *B. carinata,* охарактеризовано їх білкові продукти та проведено їх порівняння з комерційними ліпазами грибного походження. Таке порівняння було здійснено для попереднього скринінгу потенційно ефективних комерційних ліпаз для трансестерифікації олій *C. sativa* та *B. carinata.*

На основі скринінгу було відібрано ліпази Novozym 435, Resinase HT Lipozyme CALB L та Palatase 20000, які мали високий потенціал щодо FAME/FAEE конверсії олійної сировини цільових культур, та за допомогою аналітичних методів (матриці доказовості, MCDA-підходу, Pugh-матриці, SWOT-подібного аналізу та Evidence-to-Application Map) обгрунтовано їх потенційну ефективність, що також визначає наукову новизну даної роботи.

Практичне значення. Результати дисертаційного дослідження мають надзвичайно високий потенціал щодо практичного впровадження. З огляду на зростаючу потребу у розробці екологічно безпечних, сталих та ефективних технологій отримання енергоносіїв з відновлюваних природних ресурсів, автором було запропоновано комплексний підхід до отримання біодизелю з олій *C. sativa* та *B. carinata* за використання комерційних ліпаз грибного походження. В рамках даного підходу біохімічний склад олійної сировини та вибір специфічної ліпази розглядаються як взаємопов'язані складові одного технологічного процесу.

Оскільки жирнокислотний склад рослинної олії визначає технологічні характеристики біопалива, такі як в'язкість, цетанове число, окиснювальна стабільність, низькотемпературні характеристики, у роботі поєднані результати геномного, біохімічного та аналітико-технологічного блоків. Зокрема, досліджено вплив генетичної різноманітності представників родини *Camelina* та різних ліній

B. carinata на ліпідний профіль насіння, а також проаналізовано потенційну ефективність комерційних ліпаз (Novozym 435, Resinase HT Lipozyme CALB L та Palatase 20000) щодо метанольної або етанольної конверсії олій рижію або карінати.

Результати структурно-функціонального аналізу генів *DGAT1, DGAT2, LPAT2, WRI1, FAD2, FAD3, FAE1* дозволили встановити їх копійність, варіабельність, активність та механізми регуляції їх експресії, а також безпосередній вплив на ліпідний фенотип. Зокрема, було встановлено, що високий рівень експресії генів *FAD2* та *FAD3* корелює з високим вмістом поліненасичених жирних кислот в олії представників родини *Camelina*, зокрема, *C. laxa*, в той час як експресія FAE1 асоційована з більш високим вмістом довголанцюгових мононенасичених жирних кислот (наприклад, у *C. neglecta*). Ці дані є надзвичайно важливими з огляду на потенційну можливість їх використання для генетичного та біотехнологічного покращення досліджених культур для оптимізації жирнокислотного складу олій для отримання якісного біодизелю з оптимальним балансом естерів довноланцюгових та поліненасичених жирних кислот. Використання методів геномного редагування, РНК-сайленсингу, інженерії промоторних ділянок дозволить цілеспрямовано коригувати активність експресії найбільш функціонально значущих копій генів, що впливають на накопичення окремих жирних кислот, без негативного впливу на життєздатність рослин. Варіабельність генів десатураз (*FAD2, FAD3*) та елонгази (*FAE1*) жирних кислот диких представників родини *Camelina* може бути використана як джерело алелів для покращення олійного профілю *C. sativa*. В той же час, вплив варіабельності генів *DGAT1, DGAT2, LPAT2, WRI1, FAD2, FAD3, FAE1* на склад олії *B. carinata* слід інтерпретувати з обережністю, враховуючи їх багатокопійність та складну амфідиплоїдну природу даної культури. Важливим практичним результатом також є ідентифікація SSR-послідовностей у промоторах та інтронах зазначених генів ліпідного метаболізму карінати, які можуть бути використані у генотипуванні та маркер-опосередкованій селекції ліній рослин для покращення жирнокислотного складу сировини.

Не менш важливим результатом роботи з огляду на можливість практичного впровадження є встановлення алгоритму добору комерційних ліпаз, специфічних до олій *C. sativa* та *B. carinata.* Алгоритм включав попередній біоінформатичний пошук та структурно-функціональний аналіз генів, що кодують ендогенні ТАГ-ліпази рослинних культур та ліпази грибного походження, які є активними компонентами комерційних препаратів. В результаті такого аналізу було відібрано грибні ліпази, які мають спільні домени із рослинними ферментами та є компонентами препаратів Novozym 435, Resinase HT, Lipozyme CALB L та Palatase 20000. Далі на основі матриці доказовості, MCDA-підходу, Pugh-матриці, SWOT-подібного аналізу та Evidence-to-Application Map було обгрунтовано їх ієрархію за потенційною придатністю до FAME/FAEE конверсії олійної сировини цільових культур.

Враховуючи все вищезазначене, робота має надзвичайно високу практичну значущість для розробки нових технологічно гнучких, сталих, екологічно безпечних та економічно обгрунтованих методів отримання енергоносіїв із відновлюваних природних ресурсів.

Повнота викладу у фахових виданнях та апробація основних результатів. Під час виконання дисертаційного дослідження опубліковано 9 робіт, з яких 2 статті у міжнародних періодичних виданнях, індексованих у наукометричній базі даних Web of Science / Scopus (Q2 - 1, Q3 - 1), 2 статті у вітчизняних фахових наукових виданнях категорії «Б» та 5 тез у збірниках матеріалів міжнародних та всеукраїнських конференцій. Основні положення дисертації апробовано на Міжнародній науковій конференції «Біотехнологія, генетика та біохімія сільськогосподарських рослин» (Одеса, Україна, 2025); 7th Congress of the All-Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» (Lviv, Ukraine, 2024); IV конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, Україна, 2024); XI Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення в науках про життя» (Київ, Україна, 2024); 31st European Biomass Conference and Exhibition (Bologna, Italy, 2023).

Академічна доброчесність. Дисертаційна робота виконана з

дотриманням принципів академічної доброчесності. В результаті перевірки не було виявлено ознак плагіату, фабрикації, фальсифікації, текстових запозичень або інших порушень академічної доброчесності. Автор належно цитує результати інших дослідників та оформлює посилання на першоджерела, що свідчить про високий рівень наукової етики.

Оцінка структури, змісту та форми дисертації. Дисертаційна робота викладена на 245 сторінках машинописного тексту і складається зі вступу, 5 розділів, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 186 сторінок друкованого тексту. Робота містить 18 таблиць та 31 рисунок. Список використаних джерел містить 217 найменувань, з яких 2 кирилицею та 215 латиницею.

Слід відмітити, що дисертація написана грамотно та логічно, матеріал викладено академічною мовою, зрозумілою та легкою для сприйняття. Структура роботи відповідає чотирьом логічним блокам: 1) ідентифікація генів видів *Camelina* та *Brassica carinata*, залучених у метаболізмі ліпідів, характеристика їх структури, філогенетичних зв'язків та особливостей функціонування, 2) аналіз впливу особливостей експресії генів ліпідного метаболізму на жирнокислотний профіль насіння, 3) біоінформатичний аналіз генів ендогенних ТАГ-ліпаз та їх білкових продуктів з метою пошуку комерційних ліпаз грибного походження, близьких до ендогенних за доменною структурою, які б найбільш ефективно каталізували трансестерифікацію олій саме піддослідних культур, 4) аналіз на основі даних літератури потенційної придатності комерційних ліпаз для трансестерифікації олій *C. sativa* та *B. carinata.* Такий підхід дозволяє поєднати селекційне або біотехнологічне поліпшення жирнокислотного складу *C. sativa* та *B. carinata* з експериментальною оптимізацією ліпазної трансестерифікації, що відповідає основній меті роботи.

У вступі детально описано актуальність теми дисертаційного дослідження, визначено мету та завдання, охарактеризовано методи, наукову новизну,

практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, обсяг та структуру дисертації та наведено дані про апробацію результатів даної роботи.

Огляд літератури складається з чотирьох підрозділів, у яких наведено загальні характеристики біодизеля на основі рослинних олій, описано основні жирні кислоти, що входять до складу біодизелю, їх вплив на технічні властивості та якість палива, охарактеризовано гени рослин, що впливають на ліпідний метаболізм, основні традиційні методи отримання біодизелю, а також ліпази та ліпазну трансестерифікацію як альтернативний метод отримання FAME та FAEE-естерів жирних кислот, що є основними хімічними складовими біодизелю.

У розділі Матеріали і методи описано біоінформатичні, порівняльно-геномні, біохімічні, аналітичні і статистичні методи, які використовували для вирішення поставлених у роботі завдань, зокрема, пошуку та ідентифікації генів ліпідного обміну та ТАГ-ліпаз, реконструкції філогенії, повногеномного порівняння, аналізу експресії генів, визначення жирнокислотного складу олій, аналітичної оцінки ефективності комерційних ліпаз та статистичної обробки даних.

Результати та їх обговорення викладені у трьох розділах. У третьому розділі описано різноманіття генів *FAD2, FAD3* та *FAE1* у представників родини *Camelina* – проведено їх філогенетичний аналіз, проаналізовано їх внутрішньогеному синтенію, екзон-інтронну структуру, експресію у різних тканинах, консервативність, розподіл трансмембранних та консервативних функціональних доменів, а також побудовано 3D-структуру та визначено механізми регуляції їх експресії. Також, у розділі охарактеризовано жирнокислотний склад олії *C. sativa* та її диких родичів та, з огляду на виявлену міжвидову варіабельність та викладені вище результати молекулярно-генетичних досліджень, запропоновано можливі біотехнологічні або селекційні шляхи покращення якості олії *C. sativa*

Четвертий розділ присвячений опису різноманіття генів біосинтезу ліпідів *B. carinata – DGAT1, DGAT2, LPAT2, WRI1, FAD2, FAD3* та *FAE1.* Розділ побудований за такою ж логікою, як і попередній – проаналізовано філогенетичні

зв'язки даних генів в межах родини Brassica, описано їх синтенію, екзон-інтронну структуру, експресію та механізми її регуляції, консервативність, функціональні домени, побудовано 3D-структуру їх білкових продуктів. Крім того, визначено SSR в інтронах та промоторах зазначених генів та запропоновано SSR-маркери, які можуть бути використані для молекулярно-генетичного аналізу та подальшої селекції *B. carinata* для покращення якості олії. Далі було проаналізовано жирнокислотний склад олій селекційних ліній *B. carinata* та обрано найбільш перспективні лінії з огляду на високий вміст ерукової кислоти та низький – ненасичених жирних кислот. Також було узагальнено інформацію щодо впливу досліджених генів на ліпідний профіль насіння та запропоновано біотехнологічні або селекційні шляхи покращення сировини.

П'ятий розділ присвячено порівняльному аналізу ендогенних ліпаз *C. sativa, B. carinata* та промислових ліпаз грибного походження. У розділі проведено філогенетичний аналіз ідентифікованих генів ТАГ-ліпаз рослин та грибів, аналіз доменної структури їх білкових продуктів та відібрано найбільш перспективні грибні ліпази, близькі за доменною структурою до ТАГ-ліпаз рослин, які є компонентами комерційних ферментних препаратів та потенційно здатні забезпечити високий рівень конверсії олій *C. sativa* та *B. carinata.* Далі відібрані комерційні препарати, відповідно, Novozym 435, Resinase HT, Lipozyme CALB L та Palatase 20000, та за допомогою аналітичних методів визначено їх ієрархію за теоретичною придатністю до FAME/FAEE конверсії олійної сировини.

Розділ Узагальнення результатів дослідження, відповідно, узагальнює отримані результати. Зокрема, у розділі вказано, що жирнокислотний профіль рижію та камеліни визначається активністю експресії та організацією генів ліпідного обміну, здебільшого, FAD2, FAD3 і FAE1, що відкриває можливості біотехнологічного або селекційного покращення рослинного матеріалу. Також показано, що для *B. carinata* характерний високий (до 49%) вміст довголанцюгових жирних кислот в олії, зокрема, ерукової кислоти, а для *C. sativa* – високий (30-40%) вміст ненасичених жирних кислот (лінолевої та

ліноленової). При цьому, зазначається, що дані культури можуть бути взаємодоповнюваними при розробці олійної сировини для FAME/FAEE конверсії, оскільки якісне біодизельне паливо має відповідати таким критеріям, як висока окислювальна стабільність, яка напряму залежить від високого вмісту насичених жирних кислот, та придатні низькотемпературні властивості, які, навпаки, залежать від певного вмісту ненасичених жирних кислот. Також зазначено, що серед обраних ферментів, за даними аналізу, для ліпазної трансестерифікації олій рижію та карінати найбільш підходить Novozym 435, який найкраще відповідає цільовому застосуванню, Lipozyme CALB L також є перспективною ліпазою альтернативна ліпаза з високим потенціалом FAME-конверсії, Resinase HT також може бути цінною як рідка форма CALB, а Palatase 20000 L має слабшу біодизельну доказову базу.

Висновки до даної роботи чітко сформульовані, логічні, обгрунтовані, зрозумілі, та цілком відповідають поставленій меті та завданням.

Запитання та побажання щодо змісту дисертаційної роботи.

Принципових зауважень до роботи не має, але виникли питання дискусійного характеру.

1) На якому приладі робився хроматографічний аналіз, за яким протоколом? У розділі «Матеріали та методи» немає цієї інформації.

2) Чому у зразках *Camelina* не аналізували гени *DGAT1, DGAT2, LPAT2* та *WRI1* – їх не було знайдено у геномі?

3) У тексті дисертації присутні незначні помилки та неточності технічного характеру, зокрема, назва розділу 2.2 – «Реконструкція генів тубуліну», але ж у роботі аналізували не тубуліни! Крім того, у назві розділу 4.4 «Особливості жирнокислотного складу оліїнасіння…» «злиплись» два слова. Однак, ці неточності не знижують наукової цінності роботи.

4) Наскільки в Україні реально апробувати результати дослідження в умовах біореакторів, і наскільки комерційно доступні досліджені ферменти - Novozym 435, Resinase HT, Lipozyme CALB L та Palatase 20000? Чи є в Україні аналоги цих ферментів?

5) Маємо побажання щодо продовження даних досліджень, оскільки проблема «зелених» енергоносіїв, розробки сталих, ефективних та незалежних технологій продукції біопалива є надзвичайно актуальною, а запропонований підхід до продукції біодизелю є перспективним та має високий потенціал щодо впроваждення. Бажаємо віднайти можливість експериментального підтвердження теоретичних результатів даної роботи.

Загальний висновок рецензента. Дисертаційна робота Гоцуляка Віталія Ярославовича «Порівняльний аналіз застосування ліпаз для отримання біодизелю з рижію та абіссинської гірчиці» є завершеним дослідженням, що характеризується новизною, практичною значущістю та високим науковим рівнем. Робота відповідає 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 № 44 від 12.01.2022 із змінами, та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її автор, Гоцуляк Віталій Ярославович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії доктора філософії (PhD) зі спеціальності 091 – «Біологія» (галузь знань – 09 «Біологія»).

Рецензент дисертації,
кандидат біологічних наук,
науковий співробітник відділу
клітинної біології та біотехнології
ДУ «ІХБГ НАН України» Анастасія БУЗІАШВІЛІ

БУЗІАШВІЛІ АНАСТАСІЯ ЮРІЇВНА

Результат перевірки підпису	Підпис вірний
П.І.Б.	БУЗІАШВІЛІ АНАСТАСІЯ ЮРІЇВНА
РНОКПП	3375011223
Організація (установа)	ФІЗИЧНА ОСОБА
Код ЄДРПОУ	
Посада	
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для даних від Надавача)	15:10:33 07.09.2026
Сертифікат виданий	КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПриватБанк"
Серійний номер	21E4B79083A82E7F040000000A573B02679EF107
Тип носія особистого ключа	Захищений
Алгоритм підпису	dstu4145
Тип підпису	Кваліфікований
Формат підпису	CAdES-T
Сертифікат	Кваліфікований