

ВІДГУК

офіційного опонента, кандидата біологічних наук Косякової Галини Василівни на дисертаційну роботу Гоцуляка Віталія Ярославовича «Порівняльний аналіз застосування ліпаз для отримання біодизелю з рижию та абіссинської гірчиці», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – біологія

Актуальність теми. Дисертаційна робота В. Я. Гоцуляка присвячена вирішенню актуального біотехнологічного завдання — оптимізації процесів отримання біодизелю шляхом ензиматичної трансестерифікації рослинних олій за участю комерційних ліпаз. У контексті сучасних світових трендів та цілей сталого розвитку щодо декарбонізації енергетики та пошуку екологічно безпечних відновлюваних джерел палива, перехід від жорсткого хімічного каталізу до м'якого біокаталізу є критично важливим напрямом розвитку біоенергетики. Для біокаталізу, як правило, використовують комерційно доступні ензими – ліпази. Систематизація та порівняльний аналіз ефективності промислових ліпаз (зокрема Novozym 435, Lipozyme CALB L та ін.) дозволяє сформулювати підґрунтя для вибору оптимальних каталітичних систем, визначивши найбільш стійкі та економічно доцільні ензими для промислового масштабування, що підтверджує високу теоретичну та прикладну значущість обраного напрямку досліджень. В той же час не менш важливим аспектом цієї проблеми є якість сировини для отримання біодизелю, зокрема жирнокислотний склад технічних олій та можливість його оптимізації з метою покращення технічних характеристик біопалива.

Основною метою роботи було обґрунтування перспектив використання *Camelina sativa* та *Brassica carinata* як олійної сировини для виробництва біодизелю шляхом ліпазної трансестерифікації на основі аналізу генетичних передумов формування жирнокислотного складу олії та потенційної придатності комерційних ліпаз до перетворення триацилгліцеролів у жирнокислотні алкілові естери.

Для досягнення поставленої мети, необхідно було виконати наступні завдання:

1. Узагальнити літературні дані щодо біодизельного потенціалу рослинних олій, значення жирнокислотного складу для властивостей біодизелю, особливостей *C. sativa* та *B. carinata* як перспективних олійних культур, а також можливостей ліпазної трансестерифікації.

2. Ідентифікувати та охарактеризувати гени *FAD2*, *FAD3* і *FAE1* у *C. Sativa* та споріднених видів *Camelina*, проаналізувати їх копійність, геномну організацію, філогенетичні зв'язки, синтенію, екзон-інтронну структуру,

регуляторні ділянки та потенційний внесок у формування жирнокислотного складу насіння.

3. Дослідити жирнокислотний склад насіння *C. sativa* та диких видів *Camelina*, оцінити показники десатурації та елонгації жирних кислот і визначити, які особливості природної мінливості можуть бути використані для подальшого поліпшення олії рижію як сировини для паливної переробки.

4. Ідентифікувати у геномі *B. carinata* основні гени, пов'язані з біосинтезом, модифікацією та накопиченням олії, зокрема *DGAT1*, *DGAT2*, *LPAT2*, *WR11*, *FAD2*, *FAD3* і *FAE1*, та проаналізувати їх копійність, філогенетичне положення, синтенію, структурні особливості й можливе значення для формування жирнокислотного профілю.

5. Охарактеризувати жирнокислотний склад досліджених селекційних ліній *B. carinata*, визначити рівні накопичення основних жирних кислот, зокрема ерукової кислоти, та оцінити показники елонгації й десатурації як критерії технологічної придатності олії.

6. Виявити SSR-послідовності у регуляторних і структурних ділянках генів *B. carinata*, пов'язаних із ліпідним метаболізмом, та оцінити їх потенційну придатність для подальшого маркер-опосередкованого добору форм із бажаними характеристиками олії.

7. Ідентифікувати та охарактеризувати ендегенні триацилгліцерол-ліпази *C. sativa* та *B. carinata*, а також порівняти їх із комерційними ліпазами грибного походження за доменною організацією, консервативними мотивами та філогенетичними зв'язками.

8. Провести аналітичну оцінку потенційної придатності комерційних ліпаз Novozym 435, Lipozyme CALB L, Resinase HT і Palatase 20000 L до трансестерифікації олій *C. sativa* та *B. carinata* з використанням матриці доказовості, багатокритеріального аналізу, Pugh-матриці, SWOT-аналізу та Evidence-to-Application Map.

9. Обґрунтувати доцільність поєднання біологічного поліпшення жирнокислотного складу олійної сировини з добром ліпазних препаратів, придатних до її подальшої ферментативної трансестерифікації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» в рамках планових досліджень за держбюджетними темами: Науково-дослідного проекту Державної організації «Відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при НАН України» «Розробка технологічних засад отримання біодизелю з олії карінати (*Brassica carinata*) шляхом ліпазної трансестерифікації» (2024-25 pp., №

Держреєстрації: 0124U002185); проєкту НАН України «Економічно важливі олійні культури для покращення продовольчої і біологічної безпеки держави та створення нових лікарських препаратів» (2023-24 рр., № Держреєстрації: 0123U102104) у рамках програми 6541230; цільової комплексної науково-технічної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (2018-22 рр.).

Наукова новизна та достовірність одержаних результатів. Викладені в дисертаційній роботі наукові положення та висновки зроблені на основі отриманих даних у відповідності з первинною документацією. В дисертаційній роботі вперше проведено комплексний біоінформаційний аналіз жирнокислотного складу олій рижу та гірчиці абіссінської, що дало змогу встановити зв'язок між молекулярною структурою триацилгліцеролів (зокрема вмістом довколацетової ерукової кислоти (22:1n9) і стеричними обмеженнями активних центрів промислових ліпаз (Novozym 435, Lipozyme CALB L, Resinase HT, Palatase 20000 L). На основі аналізу функціональної ролі транскрипційного фактора WRI1 (WRINKLED1) та ключових ензимів ліпідного обміну (зокрема десатураз жирних кислот) обґрунтовано теоретичні підходи до цільового генетико-метаболічного конструювання рослинної сировини з оптимізованим для ензиматичної трансестерифікації жирнокислотним профілем.

Із застосуванням інструментів багатокритеріального оцінювання (MCDA, Pugh-матриць, SWOT) та методології Evidence-to-Application Framework вперше запропоновано аналітичну матрицю вибору ефективних комерційних ензиматичних препаратів залежно від вихідного або спрямовано-модифікованого складу ліпідних субстратів. Водночас, порівняльний аналіз ліпаз побудований на узагальненні літературних даних та матричному аналізі, проте відсутність власних прямих лабораторних експериментів (наприклад, визначення реального виходу FAME/FAEE під час каталізу у контрольованих умовах) дещо знижує остаточну доказову базу запропонованої автором ієрархії ефективності комерційних ліпаз.

Практичне значення одержаних результатів. Незважаючи на переважний теоретико-аналітичний характер отриманих результатів, сформований в дисертаційній роботі науково-теоретичний базис є практично значущим для біоінженерії, біотехнології та енергетичного сектору економіки.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій. Сформульовані у дисертації наукові положення та висновки мають належне теоретико-методологічне підґрунтя, яке базується на використанні сучасних системних інструментів багатокритеріального аналізу (MCDA, SWOT, Pugh-матриці). Досліджувані концептуальні моделі побудовано логічно та послідовно. Водночас ступінь обґрунтованості практичних рекомендацій щодо вибору конкретних ензиматичних препаратів обмежується переважно теоретико-аналітичним характером Розділу 5. Відсутність у роботі

результатів власних порівняльних лабораторних експериментів щодо виходу біодизеля за однакових умов каталізу обмежує можливість безпосереднього впровадження запропонованої ієрархії комерційних ліпаз у виробництво без додаткової прикладної валідації.

Висвітлення результатів у наукових публікаціях. Результати дисертаційної роботи достатньо добре висвітлені в наукових публікаціях. За матеріалами дисертації опубліковано 9 робіт, з них 4 статті, з яких 2 представлені в базах Scopus та Web of Science, та 5 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях та конгресі.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить усі розділи, передбачені вимогами до оформлення дисертації згідно з наказом МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» № 40 від 12.01.2017 року та у відповідності з Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року. Робота викладена на 245 сторінках друкованого тексту (при цьому обсяг основного тексту складає 186 сторінок), проілюстрована 18 таблицями та 31 рисунком, містить 217 використаних джерел наукової інформації.

У *анотації* ретельно викладено основні результати наукових досліджень, отриманих в ході виконання дисертаційної роботи, та наведено перелік власних публікацій автора за результатами роботи.

У *вступі* наведено інформацію, що підтверджує актуальність теми дисертаційного дослідження, зазначено мету та завдання роботи, наукову новизну та теоретичне й практичне значення отриманих результатів, зазначено особистий внесок здобувача у виконанні дисертаційної роботи, відображені основні положення дисертації, методи, які були використані для вирішення поставлених завдань та наведено результати апробації роботи.

Розділ 1 «Огляд літератури» включає 4 підрозділи, що викладені на 25 сторінках, де наведено аналітичний огляд даних вітчизняних та закордонних досліджень за темою дисертаційної роботи, а саме:

- 1.1. Біодизель та рослинні олії як сировина для його одержання;
- 1.2. Жирнокислотний склад рослинних олій та генетичні механізми його формування;
- 1.3. Основні методи отримання біодизеля;
- 1.4. Ліпази та ферментативна трансестерифікація рослинних олій.

Розділ 2 «Матеріали і методи дослідження» присвячений викладенню логіки дисертаційного дослідження та опису методів його реалізації. Детально описано методичне забезпечення, досліджуваний біологічний та об'єктний матеріал, а також використані аналітичні підходи та інструменти, зокрема:

- наведено характеристики досліджуваних зразків та селекційних ліній *Camelina sativa* (і її диких родичів) та *Brassica carinata*;

- описано метод газової хроматографії для аналізу жирнокислотного складу рослинних олій після отримання метилових естерів жирних кислот (FAME);
- представлено формули розрахунку коефіцієнтів десатурації та елонгації для оцінки спрямованості метаболічного перетворення олеїнової кислоти;
- у підрозділах 2.2.-2.6 викладено опис біоінформатичних та порівняльно-геномних методів (підходи до вирівнювання амінокислотних послідовностей та побудови філогенетичних дерев, методи оцінки еволюційного походження генів, їхньої ортології та збереження геномного оточення, підходи до аналізу рівня експресії гомеологічних копій генів *FAD2*, *FAD3* та *FAE1* у *C. sativa*, методи пошуку триацилгліцерол-ліпаз у геномах *C. sativa* та *B. carinata* й порівняння їхньої доменної організації з комерційними ліпазами грибного походження, використання BLAST-, HMM-пошуку, інструментів геномної анотації (WebScipio) та пошуку мікросателітних послідовностей (SSR) у генах *DGAT1*, *DGAT2*, *LPAT2*, *WR11*, *FAD2*, *FAD3*, *FAE1*;
- підрозділ 2.7 містить детальний опис методичного апарату для структурованого порівняння комерційних ліпазних препаратів (Novozym 435, Lipozyme CALB L, Resinase HT, Palatase 20000 L), що включає побудову матриці доказовості, багатокритеріальний аналіз (MCDA), Pugh-матрицю, SWOT-подібний аналіз та побудову карт переходів від доказів до застосування (Evidence-to-Application Map);
- підрозділ 2.8 містить інформацію про використані в дисертаційному дослідженні методи статистичної обробки даних.

Розділи 3, 4 та 5 присвячені викладенню результатів дослідження та їх обговоренню. Зокрема, у розділі 3 представлено результати комплексної оцінки генетичних чинників, природної мінливості та біохімічних характеристик олії ріжю посівного (*Camelina sativa*) та споріднених диких видів *Camelina*.

Зокрема, у підрозділах 3.1-3.3 наведено результати біоінформативного дослідження різноманіття та характеристики генів *FAD2*, *FAD3* і *FAE1* у видів *Camelina*. Для десатураз *FAD2* та *FAD3* встановлено високий рівень консервативності амінокислотних послідовностей, екзон-інтронної структури та функціональних доменів між усіма гомеологами. Водночас виявлено суттєві відмінності між гомеологічними копіями за рівнем транскрипційної експресії, структурою апстрімних регуляторних ділянок і складом потенційних сайтів зв'язування транскрипційних факторів. Це свідчить про нерівнозначність функціонального внеску окремих гомеологів у формування кінцевого жирнокислотного складу насіння. Для гена *FAE1* ідентифіковано вищий рівень послідовнісної та структурної варіабельності, порівняно з десатуразами *FAD2* і

FAD3. Виявлена варіабельність узгоджується з міжвидовими та міжгенотиповими відмінностями в інтенсивності біосинтезу та накопичення дуже довголанцюгових жирних кислот (зокрема гондоїнової C20:1 та ерукової C22:1).

Підрозділ 3.4 присвячений вивченню жирнокислотного складу олій насіння *C. sativa* та її диких родичів методом газової хроматографії. Встановлено, що більшість досліджених зразків *Camelina* характеризуються високим вмістом поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), насамперед α -ліноленової кислоти (C18:3). Виявлена міжвидова мінливість шляхів перетворення олеїнової кислоти: *Camelina neglecta* характеризується вираженим елонгаційним напрямом перетворення із підвищеним накопиченням дуже довголанцюгових жирних кислот. *Camelina laxa* має суттєво нижчі показники елонгації та мінімальний вміст ерукової кислоти.

У підрозділі 3.5 за допомогою повногеномного та синтеничного аналізу підтверджено еволюційне походження гомеологічних копій генів *FAD2*, *FAD3* і *FAE1* у геномі *C. sativa* внаслідок серії подій міжвидової гібридизації та алополіплоїдизації. Проілюстровано збереження геномного оточення (синтеничних блоків) у межах підгеномів *Camelina*, що дозволяє точно визначати ортологічні та гомеологічні взаємозв'язки між генами диких родичів та культурного ризику.

Підрозділ 3.6 присвячений обґрунтуванню можливості використання природної алельної та регуляторної мінливості роду *Camelina* для селекційного та біотехнологічного поліпшення *C. sativa*, зокрема пошуку та добору алельних варіантів із пригніченою десатурацією (оптимізація співвідношення мононенасиченої олеїнової кислоти до поліненасичених компонентів) для створення формацій ризику з більш стабільним паливним профілем олії.

У розділі 4 описано результати біоінформативного дослідження ключових генів ліпідного метаболізму та жирнокислотного профілю абіссинської гірчиці. У підрозділах 4.1-4.3 представлено результати повногеномного пошуку, зокрема ідентифіковано 24 гени основних протеїнів, залучених до біосинтезу, модифікації та накопичення запасних ліпідів у геномі *B. carinata*. Проаналізовано їхню копійність та розподіл у геномі. Досліджено еволюційне походження, філогенетичні зв'язки та збереження геномного оточення (синтению) ідентифікованих генів. Виявлено мікросателітні повтори (SSR-послідовності) у регуляторних та структурних ділянках генів, пов'язаних із ліпідним метаболізмом. Обґрунтовано можливість їх використання як потенційних молекулярних маркерів для генотипування та маркер-опосередкованого добору. Підрозділ 4.4 присвячений вивченню особливостей жирнокислотного профілю олії різних генотипів *B. carinata*. Встановлено, що досліджені лінії мають високоеруковий тип олії (у найбільш перспективних зразках вміст ерукової кислоти сягає ~49%), що підтверджує її значення як високо технічної непродовольчої сировини. Виявлено міжгенотипові відмінності у спрямованості

метаболических шляхів. Також узагальнено функціональне значення вивчених генів у регуляції метаболічного потоку між формуванням довголанцюгових мононенасичених (наприклад, ерукової) та більш ненасичених жирних кислот, а також оцінено їхній внесок у формування підсумкового олійного фенотипу.

У розділі 5 описано порівняльне біоінформативне дослідження ендогенних ліпаз цільових олійних культур із промисловими біокатализаторами грибного походження, а також проведено аналітичну оцінку ефективності застосування комерційних ліпаз для ферментативного отримання біодизелю. У підрозділі 5.1 наведено аналіз протеїнових послідовностей, доменної організації та консервативних мотивів ендогенних триацилгліцеролліпаз ріжю порівняно з промисловими грибовими ліпазами. У розділі 5.2 охарактеризовано структурні та філогенетичні особливості ендогенних ліпаз карінати у порівнянні з комерційними біокатализаторами. Встановлено, що наявність спільних доменів або мотивів не є самостійним доказом ефективності ензимів у реакціях трансестерифікації. У підрозділі 5.3. викладена аналітична оцінка потенційної придатності та ефективності ліпазної трансестерифікації олій ріжю та карінати. Із застосуванням комплексного аналітичного інструментарію для побудови ієрархії біокатализаторів проведено систематизацію та порівняльний аналіз чотирьох комерційних ліпазних препаратів (Novozym 435, Lipozyme CALB L, Resinase HT та Palatase 20000 L). Novozym 435 визначено як препарат із найсильнішою доказовою базою для FAME/FAEE-систем, препарат Resinase HT — як перспективну альтернативну ліпазу з високим потенціалом FAME-конверсії.

Завершується дисертаційна робота доволі детальним узагальненням отриманих результатів та викладенням висновків, які експериментально та теоретично обґрунтовані і відповідають меті та завданням дослідження, а достовірність не викликає сумніву. Всього сформульовано 9 ключових висновків які мають науково-теоретичне значення та практичне спрямування.

Відсутність порушень академічного плагіату. За результатами аналізу матеріалів дисертаційної роботи Гоцуляка Віталія Ярославовича «Порівняльний аналіз застосування ліпаз для отримання біодизелю з ріжю та абіссинської гірчиці», не виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикавання та фальсифікації.

Запитання та зауваження, які виникли при аналізі дисертаційної роботи.

1. Які ключові відмінності спостерігаються у жирнокислотному складі олії насіння *Camelina sativa* порівняно з її дикими родичами (наприклад, *C. neglecta* та *C. laxa*)?
2. Яким чином природна мінливість і виявлені алельні варіанти генів *FAD2*, *FAD3* та *FAE1* диких родичів ріжю можуть бути використані у селекції *Camelina sativa* для підвищення її окиснювальної стабільності (зменшення поліненасичених жирних кислот) як біопаливної сировини?

3. Які рівні накопичення ерукової кислоти та показники десатурації й елонгації було встановлено для досліджених селекційних ліній *B. carinata*, і про що свідчать міжгенотипові відмінності у спрямованості метаболічного потоку?
4. Яким чином баланс між довголанцюговими мононенасиченими та поліненасиченими жирними кислотами у досліджених лініях карінати може впливати на потенційну окиснювальну стабільність, в'язкість та температурні властивості майбутнього біодизелю?

Зауваження:

1. У тексті дисертації було зазначено, що ерукова кислота погано метаболізується в організмі ссавців. Це твердження є не зовсім вірним, оскільки метаболізується вона добре, проте біологічний ефект її перетворення не є корисним для організму ссавців, оскільки спричиняє кардіотоксичну дію (Galanty A, Grudzińska M, Paździora W, Paśko P. Erucic Acid-Both Sides of the Story: A Concise Review on Its Beneficial and Toxic Properties. *Molecules*. 2023 Feb 17;28(4):1924. doi: 10.3390/molecules28041924.
2. В сучасній науковій літературі замість термінів «білки» та «ферменти» прийнято використовувати їхні сучасні міжнародні еквіваленти: «протеїни» та «ензими».

Зазначені зауваження та запитання жодним чином не применшують наукового й прикладного значення представлених результатів, а також загального позитивного враження від дисертаційної роботи.

Висновок. Дисертаційна робота «Порівняльний аналіз застосування ліпаз для отримання біодизелю з рижію та абіссинської гірчиці» є актуальним й обґрунтованим завершеним науковим дослідженням, яке характеризується новизною, високим науковим рівнем отриманих результатів, значною практичною цінністю і відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» № 44 від 12 січня 2022 року із змінами та вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а її автор – **Гоцуляк Віталій Ярославович** заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – біологія.

Зав. відділу біохімії ліпідів

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

кандидат біологічних наук, старший дослідник

30 серпня 2026 року

Галина КОСЯКОВА

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 21:05:57 04.09.2026

Назва файлу з підписом: vidguk_Kosiakova.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 317.2 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: vidguk_Kosiakova.pdf
Розмір файлу без підпису: 317.2 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Косякова Галина Василівна

П.І.Б.: Косякова Галина Василівна

Країна: Україна

РНОКПП: 2805507102

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 21:05:18 04.09.2026

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 514B5C86A1E5DA110400000084196101791C2406

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)

Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2026.08.19 13:00