

В І Д Г У К

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, академіка НАН України, завідувача відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України Філоненка Валерія Вікторовича на дисертаційну роботу аспірантки ЗУО Мінсін (ZUO Mingxing) «Регуляція деградації β -галактозидази та метаболічна інженерія ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*», представленій на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – біологія, галузь знань 09 – біологія

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Дисертація ЗУО Мінсін представляє комплексне та інноваційне дослідження з молекулярної біології, метаболічної інженерії та біотехнології, яке спрямоване на три основні цілі:

1. Дослідження механізмів деградації білків під час перенесення клітин з одного вуглецевого субстрату на інший у *Komagataella phaffii* (біотехнологічно-важливі дріжджі, які раніше називалися *Pichia pastoris*), що відомі своєю здатністю використовувати метанол як єдине джерело вуглецю та енергії. Суттєвою проблемою у виробництві рекомбінантних білків за допомогою цих дріжджів є нестабільність цих білків, особливо в разі перенесення клітин з метанолу в середовище з глюкозою. Під час цього перенесення ферменти, що використовують метанол, зазнають протеолітичної деградації, що значно обмежує потенціал *K. phaffii* для широкомасштабного промислового застосування. Раніше в лабораторії проф. А. Сибірного був описаний процес селективної автофагійної деградації ряду власних і гетерологічних білків після перенесення клітини з метанольного середовища на глюкозне. Для вирішення цієї проблематики необхідні нові мутанти, дефектні в такій автофагійній деградації. Зуо М. вперше використала хімічний мутаген N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин для ізоляції штамів із порушенням деградації гетерологічної β -галактозидази (експресованої під промотором *FLDI*, індукованим метанолом). Дослідження показало, що підвищена активність β -галактозидази в мутантних штамів є результатом селективних дефектів шляху автофагії, встановлюючи зв'язок між регуляцією автофагії та оптимізацією продукції білка. Більш детальне вивчення властивостей ізольованих мутантів дозволило розділити їх на дві групи: з одночасною деградацією пероксисомного ферменту алкогольоксидази та без неї, яка, як відомо, відбувається шляхом пексофагії. Гени, які беруть участь у деградації як β -галактозидази, так і алкогольоксидази, можуть бути гомологічними до відомих генів *ATG*, тоді як ті, що беруть участь у селективній автофагії лише цитозольної β -галактозидази, найімовірніше, поки що не ідентифіковані. Таким чином, ізольовані дисертанткою штамів допоможуть з'ясувати механізми селективної деградації цитозольних білків.

2. Дисертантка виявила нові домінантні селективні маркери для трансформації іншого виду неконвенційних метилотрофних дріжджів *Ogataea polymorpha*, що відповідає зростаючій потребі у відповідних інструментах селекції для генетичної інженерії. Зуо М. сконструювала два мутантних варіанти гена *AURI*: перший варіант містить подвійну заміну лейцину (Leu) на фенілаланін (Phe) у 53 положенні і гістидину (His) на тирозин (Tyr) у 72 положенні, тоді як другий варіант містить одну заміну аланіну (Ala) на цистеїн (Cys) у 156 положенні. Примітно, що варіант гена *AURI*, що містить заміну A156C, виявився ефективним як селекційний маркер для трансформантів *O. polymorpha*, стійких до ауреобазидину. Крім того, була сконструйована плазміда, що містить ген *IMH3*, для оцінки його потенціалу як селекційного маркера. Результати показали, що інтеграція однієї додаткової копії гена *IMH3* в геном *O. polymorpha* дикого типу була достатньою для надання трансформантам стійкості до мікофенолової кислоти. Рекombінантні штами *O. polymorpha*, що використовують ген *IMH3* як селективні маркери надекспресії *TAL1* (цитозольної трансальдолази), *TKL1* (цитозольної транскетолази) і *AOX1* (пероксисомної алкогольоксидази), продемонстрували значно вищу продукцію етанолу в результаті ферментації ксилози порівняно з вихідним штамом. Це успішне застосування вказує на те, що ген *IMH3* є ефективним селективним маркером для цього виду дріжджів. Ці інновації представляють перше успішне застосування модифікованого нами гену *AURI* і нативного гену *IMH3* як нових домінантних маркерів для селекції рекombінантного штаму *O. polymorpha*, що значно розширює доступний набір інструментів для дріжджових експресійних систем. Такі системи відбору особливо цінні в комерційному застосуванні, де дріжджові вектори, що містять лише нативні гени (самоклонуючі вектори), запобігають передачі генів, що надають патогенам стійкість до антибіотиків. Крім того, ці системи самомаркування забезпечують ефективне вирішення проблеми трансформації прототрофних промислових штамів дріжджів, які, зазвичай, складно модифікувати за допомогою звичайних ауксотрофних маркерів.

3. Третій напрямок досліджень дисертантки стосувався глобальної проблеми виробництва альтернативної енергії, особливу увагу зосереджуючи на біоетанолі з лігноцелюлозної біомаси — біоетанолі другого покоління. Порівняно з етанолом першого покоління, отриманим із харчових культур, таких як кукурудза, цукрова тростина та солодка картопля, етанол другого покоління, що виробляють із побічних продуктів сільського господарства, привертає все більше уваги, оскільки він не конкурує з харчовими ресурсами людини. Однак суттєвою технічною перешкодою для досягнення високої продуктивності у виробництві лігноцелюлозного етанолу є відсутність стійких мікробних штамів, здатних ефективно одночасно ферментувати як пентозні, так і гексозні цукри, отримані гідролізом лігноцелюлозної біомаси. Таким чином, конструювання мікроорганізмів із здатністю до ефективної ферментації ксилози є важливою передумовою для створення ефективних промислових процесів для перетворення лігноцелюлози в паливний етанол. Зуо М.

досліджувала роль транскрипційних факторів і сенсорів цукрів у ферментації ксилози *O. polymorpha*. У результаті надмірна експресія *HXS1* збільшила виробництво етанолу на 10% з глюкози та на 40% з ксилози штамом ВЕР/Δcat8, тоді як у штамі дикого типу виявили посилене бродіння глюкози та ксилози, підвищивши утворення етанолу з ксилози з 0,49 г/л до 0,83 г/л через 72 години. Подібним чином, надекспресія *AZF1* підвищила продукцію етанолу на 10% з глюкози в обох штаммах, тоді як у середовищі з ксилозою вона зросла в 2,4 рази у штаму дикого типу і на понад 30% у штама ВЕР/Δcat8. Дослідження отриманих штамів, які надпродукують етанол, показало, що надекспресія сенсорного гена *HXS1*, схожого на транспортер гексози, і гена *AZF1*, що має сенсорні властивості, може підвищити продукцію етанолу під час ферментації глюкози та ксилози, закладаючи основу для подальшої розробки більш ефективних продуцентів етанолу з лігноцелюлозних гідролізатів.

Ці дослідження **демонструють наукову новизну** та відповідають сучасним досягненням біології та біотехнології. Використана методологія є комплексною, включає сучасні методи генетичної та метаболічної інженерії, клонування генів, біохімічний та мікроскопічний аналіз, а також традиційні підходи до виділення мутантів.

Оцінка змісту та завершеності дисертації.

Дисертаційна робота ЗУО Мінсін відповідає стандартній академічній структурі з наступними розділами «Анотація», «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи дослідження», «Результати та їхнє обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів», «Цитована література», «Висновки» та «Додаток», де представлено публікації здобувачки за темою дисертації. Дисертація охоплює 160 сторінок і включає 22 рисунки, 5 таблиць і 229 літературних посилань, що відповідає вимогам до дисертаційних робіт.

У дисертації чітко представлені цілі та завдання роботи. Дисертаційна робота робить цінний внесок у наукові знання із практичним застосуванням і забезпечує основу для майбутніх дослідницьких ініціатив.

Повнота викладення основних положень, висновків і рекомендацій дисертації в наукових працях, зарахованих за темою дисертації.

Результати дослідження відображені в 7 наукових публікаціях автора, включаючи 3 статті в міжнародних і вітчизняних журналах, таких як *Yeast*, *Microbial Cell Factories* і *Cytology and Genetics*, індексованих у базах даних *Scopus* і *Web of Science Core Collection*. Здобувачка є першим автором в одній публікації. Суттєвий і ґрунтовний особистий внесок здобувачки є очевидним у всіх цих роботах, а результати були додатково представлені на чотирьох вітчизняних і міжнародних конференціях, конгресах і симпозіумах.

Відсутність порушення академічної доброчесності.

В дисертації дотримано принципів академічної доброчесності. Це самостійне

наукове дослідження, яке відображає авторські ідеї та напрацювання, що сприяло вирішенню поставлених завдань. Теоретичні положення та висновки сформульовані дисертантом особисто. Ідеї та положення інших науковців, використані у дослідженні, належним чином процитовані та слугують обґрунтуванню авторських висновків.

Дискусійні питання і зауваження.

Вважаю за доцільне зупинитися на таких дискусійних положеннях:

1. У розділі 3.1.1 Скринінг мутантів, дефектних у деградації β -галактозидази в метилтрофних дріжджах *Komagataella phaffii* – Чому в цьому експерименті використовували MNNG для мутагенезу штаму? Чи застосовували до нього інші мутагенні методи лікування, наприклад УФ-мутагенез? Які переваги має мутагенез MNNG порівняно з іншими методами мутагенезу? Крім того, який відсоток проаналізованих колоній є мутантами, що індуковані MNNG?

2. У розділі 3.1.1 Скринінг мутантів, дефектних щодо деградації β -галактозидази в метилтрофних дріжджах *Komagataella phaffii*, **рисунк 3.4.** - Згідно з рисунком, два штами MNNG продемонстрували повну втрату активності алкогольоксидази (АОХ) після 18 годин культивування в середовищі глюкози. Рекомендую скоротити період культивування приблизно до 8 годин і повторно оцінити відносну ферментативну активність АОХ. Цю скорочену часову точку можна порівняти з даними 18-годинного культивування, щоб з'ясувати потенційні часові зміни у функціональності ферменту.

3. У розділі 3.1.1 Отримані мутантні штами, що проявляють дефект у деградації β -галактозидазної активності при перенесенні з метанолу на середовище з глюкозою, – Чи було ідентифіковано ключовий білок, пов'язаний із цим дефектом деградації?

4. У розділі 3.2.1 Відбір штамів *O. polymorpha*, стійких до ауреобазидину, **рисунк 3.8** - Яким було обґрунтування введення цілеспрямованих точкових мутацій у ген *AURI* при одночасному збереженні гена *IMH3* у його дикотипній формі? Які наукові міркування лягли в основу цієї диференційованої стратегії мутагенезу?

5. У розділі 3.3.2 Надекспресія генів *AZF1* і *HXS1* демонструє підвищення виходу етанолу під час бродіння ксилози - Який рівень продуктивності етанолу з ксилози вважався б економічно доцільним для промислового впровадження? Крім методів, згаданих у цій дисертації, які альтернативні стратегії можна застосувати для оптимізації ефективності перетворення ксилози в етанол?

Проте ці зауваження не применшують загальної високої оцінки дисертаційної роботи.

Загальний висновок.

Підсумовуючи, дисертація **ЗУО Мінсін** є значним внеском у галузь дріжджової біотехнології та метаболічної інженерії. Отримані результати мають високий потенціал як для фундаментальних досліджень, так і для комерційного використання, зокрема у виробництві біоетанолу та в конструюванні рекомбінантних білкових систем. Сильними сторонами роботи є оригінальність висновків, методологічна різноманітність та відповідність промисловим потребам. Загалом дослідження відповідає високим стандартам дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії завдяки своїй актуальності, науковій новизні, практичній значущості та надійності отриманих результатів.

Дисертаційна робота **ЗУО Мінсін** повністю відповідає вимогам «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) та наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації». ЗУО Мінсін заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю **091 – біологія**.

Доктор біологічних наук,
професор, академік НАН України,
завідувач відділу сигнальних
систем клітини, Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України

Філоненко Валерій Вікторович