Відзив

офіційного опонента на дисертаційну роботу

«**Регуляція деградації β-галактозидази та метаболічна інженерія ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів *Komogataella phaffii* та *Ogataea polymorpha***» аспірантки ЗУО Мінсін (ZUO Mingxing), представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження

Komagataella phaffii and *Ogataea polymorpha*» з Ascomycota є одними з добре вивчених видів метилотрофних дріжджів, залишаючись важливим об'єктом фундаментальних і прикладних досліджень. Як відомо, метилотрофні дріжджі містять унікальні ферменти, залучені в утилізацію метанолу, які мають специфічну внутрішньоклітинну компартменталізацію (Mastropietro et al., 2021). Багато з цих ензимів характеризуються високою надекспресію і регулюються джерелами Карбону. Однак, у середовищі з глюкозою більшість цих ферментів зазнають швидкої деградації та протеолізу, що значно обмежує потенціал метилотрофних дріжджів у промисловому застосуванні (Dmytruk et al., 2021). Механізми інактивації цитозольних ферментів залишаються недостатньо вивченими.

Відомо, що автофагія є одним з основних шляхів внутрішньоклітинної деградації протеїнів. Модифікацію шляхів деградації використовують для посилення синтезу гетерологічних білків у клітинах дріжджів. Метилотрофні дріжджі вважаються зручними модельними системами для з'ясування механізмів автофагії, а також експресії генів, залучених до автофагії та пексофагії, значна частина яких була вперше ідентифікована у *O. polymorpha* та *K. phaffii* науковцями з Інституту біології клітини НАН України. На сьогоднішній день, незважаючи на великий масив інформації про механізми деградації білків і клітинних органел, механізми селективної деградації власних цитозольних і гетерологічних білків в метилотрофних дріжджах залишаються маловивченими. Для дослідження механізмів автофагічної деградації цитозольних білків важливо виділити мутанти, у яких цей процес

проходить з порушеннями. Ці делеційні мутанти сприяють дослідженню взаємозв'язку між аутофагією та секрецією білка. Ідентифікація специфічних генів, що пов’язані з дефектами аутофагії, може виявити нові регуляторні шляхи та мішені для модифікації аутофагії, що сприятливо прискорить процес промислового виробництва білка дріжджами в майбутньому.

Питання механізмів термотолерантності, продукції гетерологічних білків та високотемпературної алкогольної ферментації метилотрофних дріжджів є важливими як з наукової так і з практичної точки зору [Дмитрук, 2010; Стасик. 2019]. В роботі для цього використовували *Ogataea polymorpha*. Незважаючи на суттєві досягнення у розробці молекулярних методів для цього виду, маркери для самоклонування досі залишаються малодоступними, що зумовило завдання другої частини роботи. Третя частина роботи зосереджена на продукції біоетанолу з ксилози в *O. polymorpha.* Дійсно виробництво етанолу другого покоління з використанням сільськогосподарських відходів, таких як лігноцелюлозна біомаса, привертає все більшу увагу. Розуміння механізмів, які лежать в основі продукції біоетанолу з лігноцелюлозної сировини, необхідне для вдосконалення промислового застосування та підвищення економічності біопалива. Крім того, актуальним є розроблення штамів - стабільних надпродуцентів етанолу. Саме тому, окреслені питання складають актуальність дисертаційного дослідження і формують мету і ключові завдання роботи.

Зв’язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами.

Представлена робота була виконана як одна з частин фундаментальних досліджень у відділі молекулярної генетики та біотехнології Інституту клітинної біології НАН України за темами: «Президентські дискреційні гранти підтримки України» від Фонда Саймонса (Simons Foundation), гранти № 1030281 і № 1290613; Китайсько-український міжурядовий проекту обміну (8); Національний фонд природничих наук Китаю (NSFC; №

32060034/№ 32460051); Китайська стипендіальна рада для фінансової підтримки (China Scholarship Council № 201908520075).

Новизна дослідження та одержаних результатів

З використанням хімічного мутагену MNNH у *K. phaffii* виділено штами, що демонструють більш високу активність β-галактозидази після переходу клітини з метанолу на глюкозу порівняно з вихідним штамом. В умовах азотного голодування виявлено дефекти росту у вибраних мутантів, що свідчить про порушення загальної аутофагії. Зокрема, мутанти MNNG-1 і MNNG-3 демонструють дефекти як селективної аутофагії цитозольної β-галактозидази, так і селективної пексофагії, тоді як мутанти MNNG-2 і MNNG-4 характеризуються виключно дефектами селективної аутофагії цитозольної β-галактозидази. Отримані результати важливі для вивчення порушення механізмів деградації цитозольного білка внаслідок дефіциту аутофагії, пропонуючи нове розуміння для підвищення виходу рекомбінантного білка в майбутніх застосуваннях.

Отримано перші докази використання сконструйованих генів AUR1 і нативних генів IMH3 як домінантних маркерів для відбору рекомбінантних штамів *O. polymorpha*. Рекомбінантний штам, сконструйований з використанням гена IMH3 як селективного маркера (що надекспресує гени TAL1, TKL1 і AOX1) продемонстрував підвищену продукцію етанолу порівняно з батьківським штамом. Використання таких селективних маркерів є найбільш придатним для комерційного застосування метаболічно сконструйованих штамів *O. polymorpha* з бажаними характеристиками, оскільки запобігає перенесенню генів, що надають патогенам стійкість до антибіотиків. Сконструйовано трансформанти, що надекспресують ген AZF1, який кодує активатор транскрипції, що бере участь у сприйнятті вуглеводів. Трансформант продукував на 10% більше етанолу в середовищі глюкози та в 2,4 рази більше етанолу в середовищі ксилози порівняно з диким типом. Отримані результати показали, що надмірна експресія генів HXS1 і AZF1 може підвищити вироблення етанолу з глюкози, і особливо з ксилози. Ці

висновки важливі для створення більш ефективних виробників етанолу з лігноцелюлозних гідролізатів у майбутньому.

Практичне значення одержаних результатів.

У цьому дослідженні чотири мутантних штами з дефіцитом β-галактозидази були отримані шляхом мутагенезу через MNNG. Методи мутагенезу, розроблені в цьому дослідженні, можуть бути розширені для отримання інших мутантних штамів. За результатами досліджень мутований ген AUR1 і нативний ген IMH3 можуть бути застосовані як нові домінантні селективні маркери в дріжджах O. polymorpha. Крім того, ген IMH3 був успішно використаний для конструювання покращеного продуцента етанолу з ксилози в *O. polymorpha*. Ці результати можуть бути корисними для комерційного застосування метаболічно сконструйованих штамів із бажаними характеристиками, оскільки вони запобігають передачі генів, що надають патогенам стійкість до антибіотиків, і запобігають виробленню токсичних або алергенних білків рекомбінантними штамами. Сконструйовані рекомбінантні штами *O. polymorpha*, які надекспресують гени HXS1 та AZF1, продемонстрували підвищену здатність до виробництва етанолу під час спиртового бродіння глюкози, особливо ксилози. Результати вказують на те, що експресія відповідних генів чутливих до глюкози та ксилози або транспортерів білків допомагає підвищити ефективність перетворення ксилози в етанол. Це допомагає в подальшому вивченні генів, пов'язаних з метаболізмом ксилози. Водночас отримані в цьому дослідженні рекомбінантні штами можуть слугувати стартовими штамами для підвищення ефективності етанольного бродіння з цукрів, отриманих з лігноцелюлозних гідролізатів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Здобувачем виконано всі заплановані завдання і одержано значний обсяг оригінального експериментального матеріалу. Достовірність результатів забезпечена широким спектром сучасних методів дослідження,

зокрема, фізіологічними, біохімічними методами, молекулярно–генетичним аналізом, методами генної інженерії, включаючи розробку домінантних селективних маркерів, методами світлової і люмінесцентної мікроскопії та ін. Отримані дані пройшли коректну статистичну обробку і представлені у вигляді графічних даних і таблиць. В роботі аналізувались бази даних для *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha,* використовувалось програмне забезпечення з відкритого доступу і з веб-сервісу Національного центру біотехнологічної інформації web service from the National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA).

Дисертація складається із наступних розділів: Вступу, Огляду літератури, розділу Матеріали та методи, трьох розділів експериментальних досліджень, розділу Аналіз та узагальнення результатів та Висновків. Список використаної літератури включає 229 літературних джерел. Дисертація викладена на 160 сторінках друкованого тексту, з яких основна частина займає 93 сторінки. Робота містить 22 рисунки, п'ять таблиць, одну формулу і Додаток. Висновки відповідають отриманим експериментальним даним та завданням. Реферат відображає зміст дисертації.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.

За результатами дисертаційної роботи опубліковано сім наукових праць, з них 3 статті у фахових міжнародних виданнях, індексованих у базах даних Scopus і Web of Science Core Collection (Q1, Q2 і Q4) та 4 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях і наукових симпозіумах.

Особистий внесок здобувача.

Для виконання поставлених завдань аспірант розробив за участю наукового керівника план дослідження. Здобувач наукового ступеню та науковий керівник проаналізували результати експериментальних досліджень. Аспірант займався розробкою і пошуком методів для досягнення поставленої мети експерименту. Підготовку наукових публікацій здійснював аспірант за консультативної підтримки наукового керівника, а відбір журналу

– науковий керівник. Результати, викладені в дисертації, отримані шляхом проведення наукових досліджень аспірантом у співпраці зі співавторами публікацій.

Дискусійні положення, запитання та зауваження щодо змісту дисертації

Як клітинний біолог я можу оцінити цитологічну складову даної роботи: дисертація щодо змісту, планування, результатів та висновків викладена дуже чітко та логічно. У мене немає зауважень по суті роботи.

Щодо оформлення, то я би порадила інше формулювання мети, назви і об'єкту дослідження. Об'єкт дослідження, як відомо, – це проблема, що досліджується чи розробляється. Тому, на мій погляд, об'єктом дослідження могли би бути шляхи деградації цитозольних білків у метилотрофних дріжджів (*K. phaffii*) і генетичне конструювання високопродуктивних штамів *O. polymorpha*. Три частини роботи можна було б об'єднати єдиною метою і назвою: Розробка шляхів отримання високопродуктивних штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha* для застосування у метаболічній інженерії метилотрофних дріжджів. У такому випадку дисертація б мала більш єдиний зміст.

У роботі іноді трапляються технічні помилки чи невдалі формулювання.

Але наведені зауваження не мають принципового характеру і не знижують наукової цінності роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня доктора філософії

Дисертаційна робота ЗУО Мінсін «Регуляція деградації β-галактозидази та метаболічна інженерія ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів *Komogataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*» є завершеною науковою працею. Актуальність обраної теми, застосування сучасних експериментальних методів та підходів, обґрунтованість наукових положень, висновків, сформульованих у дисертації, їх достовірність та наукова новизна, повнота викладу матеріалів в опублікованих працях свідчать про відповідність представленої роботи 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», а її автор, ЗУО Мінсін (ZUO Mingxing)**,** заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Головний науковий співробітник
відділу геноміки та молекулярної
біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України», д.б.н., с.н.с. О.А. Кравець

25 березня 2025 р.