

Рецензія

на дисертацію Мінсін Зуо "Регуляція деградації β -галактозидази та метаболічна інженерія ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*" на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність теми.

Метилотрофні дріжджі *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha* є високоефективними над-продуцентами рекомбінантних білків, що мають важливе промислове значення. Основною проблемою при одержанні цих білків є їхня нестабільність, особливо при перенесенні клітин з середовища, яке містить метанол, у середовище з глюкозою. За таких умов на транскрипційному рівні репресуються метанол-утилізуючі ензими, що призводить до деградації та протеолізу клітинних ензимів. Тому підвищення експресії та стабільності гетерологічних білків неможливе без глибокого розуміння механізмів, які лежать в основі деградації цитозольних білків у метилотрофних дріжджах. Останні дослідження вказують на можливий зв'язок між дефіцитом автофагії та підвищеною продукцією білків. Для подальшого вивчення механізмів деградації цитозольних білків у *K. phaffii* важливо мати мутантні клітини зі специфічними дефектами в автофагії. Цій проблемі присвячена перша частина дисертації М. Зуо. Шляхом хімічного мутагенезу було одержано штами з порушеною деградацією гетерологічної β -галактозидази, що експресується під контролем метанол-індукованого промотора FLD1. Використовуючи регуляцію селективної автофагії для оптимізації системи експресії дріжджів і підвищення продукції цільових білків, можна сприяти подальшому розвитку процесу індустріального виробництва білків за допомогою дріжджів.

Два інші наукові напрямки дисертації М. Зуо пов'язані з дріжджами *O. polymorpha*. У другій частині роботи М. Зуо повідомляє про розробку нових домінантних селективних маркерів для дріжджів *O. polymorpha*, які можуть бути використані в експериментах з метаболічної інженерії для відбору рекомбінантних штамів з бажаними фізіологічними характеристиками.

Два потенційні маркери були протестовані для їхнього потенційного використання у метаболічній інженерії для *O. polymorpha*: мутований ген *AUR1* та нативний ген *IMH3*, які відповідно забезпечують стійкість до авребазидину та мікофенолової кислоти. Були одержані рекомбінантні штами *O. polymorpha*, що надекспресують гени *AUR1* і *IMH3*, та продемонстровано, що вони значно ефективніше продукують етанол при ферментації ксилози порівняно з батьківським штамом. Це перша інформація про використання інженерного гена *AUR1* та нативного гена *IMH3* з *O. polymorpha*, як домінантних маркерів для відбору рекомбінантних штамів *O. polymorpha*.

Третій науковий напрямок дисертації пов'язаний з пошуком альтернативних джерел енергії, а саме, з виробництвом біоетанолу з лігноцелюлозної біомаси шляхом покращення утилізації ксилози. Розробка ефективних технологій виробництва паливного етанолу з недорогих відновлюваних сировинних матеріалів, таких як лігноцелюлозні відходи сільськогосподарської та деревообробної промисловості, має велике економічне та екологічне значення. Ключовою передумовою для зниження витрат на виробництво є виявлення та розробка генетично модифікованих організмів, здатних гідролізувати та ферментувати вивільнені цукри. Існує дефіцит штамів, здатних одночасно перетворювати глюкозу та ксилозу на етанол при підвищених температурах, що ускладнює впровадження у виробництво. Отже, одержання та оптимізація мікробних продуцентів етанолу з нехарчових сировинних матеріалів є нагальним пріоритетом. Для цього було потрібно вирішити фундаментальні задачі, зокрема, дослідити роль досі маловивчених факторів транскрипції в алкогольній ферментації ксилози (та глюкози). У дисертаційній роботі М. Зуо зосереджується на дослідженні ролі цукрових сенсорів, включаючи фактори транскрипції та сенсори, що не транспортують цукри, у процесі ферментації ксилози, щоб з'ясувати їхню функцію в дріжджах *O. polymorpha*. Отримані фундаментальні висновки та створені штами-продуценти етанолу, мають біотехнологічне значення як платформа для подальшого розвитку нових технологій одержання етанолу з лігноцелюлозних гідролізатів.

Таким чином, рецензоване дослідження охоплює три основні напрями:

1. Одержання мутантів з дефектами в деградації цитозольного β -галактозидази в метилотрофних дріжджах *Komagataella phaffii* за допомогою хімічного мутагена N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину.
2. Розробка нових домінантних селективних маркерів для майбутнього застосування у метаболічній інженерії *Ogataea polymorpha*.
3. Проектування та впровадження стратегій метаболічної інженерії для створення штамів *O. polymorpha* з підвищеною ефективністю продукції етанолу з ксилози.

Для вирішення цих завдань М. Зуо застосувала різноманітні генетичні, мікробіологічні та біохімічні методи дослідження. Широко використовувалися методи молекулярної біології, зокрема хімічний мутагенез, екстракція ДНК з клітин дріжджів та бактерій, гідроліз ДНК за допомогою ендонуклеаз, елюція фрагментів ДНК з агарозних гелів, конструювання векторів, трансформація дріжджів, аналіз рекомбінантних штамів дріжджів за допомогою методу ПЛР. Ефективність автофагії контролювалась за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Активно використовувався комп'ютерний і інформаційний аналіз баз даних відомих генів.

Представлена робота була виконана як одна з частин фундаментальних досліджень у відділі молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України.

Наукова новизна. Аналіз плагіату підтверджує, що оригінальність отриманих результатів перевищує 96%. Усі дані, представлені автором, є новими.

Основні наукові та практичні результати дослідження підсумовуються в наступних висновках:

1. Були відібрані за допомогою хімічного мутагенезу та детально охарактеризовані чотири мутантні штами дріжджів *K. phaffii* з підвищеною активністю β -галактозидази. Усі відібрані мутанти показали більшу стабільність цитозольних білків порівняно з батьківськими штамами після переносу з метанольного середовища в глюкозне і мали дефекти в автофагії цитозольної β -галактозидази, при цьому два з мутантів демонстрували дефекти в селективній пексофагії. Отримані результати відкривають нові можливості для вивчення специфічних генів дріжджів *K. phaffii*, пов'язаних з дефектами автофагії, а також основних молекулярних механізмів, що регулюють автофагію та клітинний гомеостаз в метилотрофних дріжджах.

2. Уперше було показано, що мутантний ген *AUR1* та нативний ген *IMH3* можуть служити ефективними новими домінантними селективними маркерами в дріжджах *O. polymorpha*. Крім того, рекомбінантний штам, створений із використанням гена *IMH3*, ефективніше продукував етанол порівняно з батьківським штамом. Такі селективні маркери є корисними при конструюванні комерційно перспективних штамів *O. polymorpha* з бажаними характеристиками, оскільки це запобігає переносу генів, що надають антибіотичну стійкість, на патогенні мікроорганізми.

3. Було створено кілька трансформантів дріжджів *O. polymorpha*, які надекспресують ген *AZF1*, що кодує активатор транскрипції, залучений до сенсингу вуглеводів, а також рекомбінантні штами, що надекспресують ген *HXS1*, що кодує сенсор, схожий на транспортер гексоз. В результаті було отримано штами дріжджів, що ферментують ксилозу, які є кращими продуцентами етанолу порівняно з диким типом і створеним раніше штамом-продуцентом етанолу BEP/ Δ cat8.

Автором було виконано великий обсяг роботи, що вимагав високого рівня кваліфікації та майстерності в сучасних методах дослідження. Отримані експериментальні дані були ретельно проаналізовані, представлені результати є надійними. Основні наукові висновки та результати добре обґрунтовані. Дисертація добре ілюстрована, містить 22 малюнки, 5 таблиць та одну формулу. Список літератури включає 224 джерела. Наприкінці роботи міститься один додаток.

Матеріали дисертації всебічно відображені в 7 наукових публікаціях автора, з яких 3 статті опубліковані в журналах, індексованих у базах даних Scopus та Web of Science Core Collection (з них – 2 статті у міжнародних журналах). Результати дослідження

підтверджуються участю автора в чотирьох національних та міжнародних конференціях, конгресах та симпозіумах.

Однак є питання, зауваження та рекомендації до автора дисертації.

1). Сторінки 47-50. Чи існують суттєві відмінності в механізмах макроавтофагії між *K. phaffii* та *O. polymorpha*? Як ці механізми порівнюються з механізмами у *S. cerevisiae*?

2). Сторінки 90-91, малюнки 3.2 і 3.3. Чи було достатньо 18 годин для спостереження за повним процесом деградації білків через автофагію у WT-штамі? Чому для наступного експерименту використовується 24 години?

3). Чи стабільні мутанти NMG1 та NMG3 (на малюнку 3.3)? Було б корисно оцінити життєздатність клітин у цьому експерименті для більш точної інтерпретації отриманих результатів, зокрема щодо потенційної гетерогенності культур, що може впливати на достовірність даних.

4). Сторінка 92. Пояснить, чому саме штам SMD1163 може бути кращим для біотехнологічних застосувань порівняно з іншими мутантами? Можливо, завдяки його стабільності, продуктивності або інших важливих характеристик для промислових процесів?

5). Сторінка 100. Чи були просеквеновані плазмиди і чи була підтверджена наявність мутацій?

6). Сторінка 110. Чи була просеквенована конструкція для підтвердження відсутності небажаних мутацій? Чи оцінювали рівень надекспресії генів *HXS1* та *AZF1* у штаммах?

7). Чи має значний вплив присутність етанолу (у зазначених концентраціях) на швидкість росту дріжджів та на їхню продуктивність в процесі бродіння?

8). Сторінка 117. У тексті, що передує таблиці 3.1, назви одиниць вимірювання мають бути виправлені на такі, які подано у таблиці 3.1: Неправильна назва: (mg/g biomass/h). Правильна назва: mg/(g biomass · h) або mg · g biomass⁻¹ · h⁻¹. Неправильна назва: (mg/L/h). Правильна назва: mg/(L · h) або mg · L⁻¹ · h⁻¹.

9). В таблиці 3.1 відсутня назва штаму в першому рядку таблиці.

10). Перелік посилань: №№ 16 і 22 є однаковими; №№ 16, 20, 48, 63, 81, 92, 138, 141, 205, 212 не містять повних бібліографічних даних.

11). Є незначні граматичні помилки в українській версії дисертації.

C.12: мутанти з дефектною **в** деградацією; отримано інсерційний~~ого~~-мутанта;

C.18: над~~р~~продуцентів.

Однак ці зауваження не знижують загальну високу оцінку роботи і можуть бути легко виправлені.

Заключення.

1. Дисертаційна робота Мінсін Зуо «Регуляція деградації β -галактозидази та метаболічна інженерія ферментації ксилози в метилотрофних дріжджах *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*» є завершеним науковим дослідженням, яке висвітлює наступні результати:

- Одержано стабільні мутанти дріжджів *K. Phaffii* з дефектами в деградації β -галактозидази, які ефективними продуцентами рекомбінантних білків, та інструментами для вивчення молекулярних механізмів автофагії та клітинного гомеостазу.

- Розроблено нові домінантні селективні маркери для майбутніх застосувань у метаболічній інженерії дріжджів *O. polymorpha*.

- Розроблено та впроваджено стратегії метаболічної інженерії для створення штамів *O. polymorpha* з підвищеною ефективністю продукції етанолу з ксилози.

2. Результати роботи опубліковано в фахових наукових журналах і представлено на кількох національних та міжнародних конференціях. Зміст дисертації відповідає спеціальності 091 – Біологія.

3. На завершення, дисертаційна робота Мінсін Зуо робить суттєвий внесок у розуміння механізмів автофагії в метилотрофних дріжджах, розробку нових генетичних інструментів для метаболічної інженерії та оптимізації процесів промислового виробництва етанолу. Дослідження має важливі практичні наслідки для біотехнології, зокрема в контексті виробництва рекомбінантних білків та відновлювального біопалива.

Зважаючи на актуальність, наукову новизну, практичне значення та надійність отриманих результатів, дисертаційна робота Мінсін Зуо 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». Мінсін Зуо заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Старший науковий співробітник відділу аналітичної
біотехнології
Інституту біології клітини НАН України,
кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник

Гайда Г.З.