ВІДГУК

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*»,

представленої на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю **091 – біологія,** галузь знань **09 – біологія**

Ознайомившись із дисертацією Зуо Мінсін, вважаю, що відповідна дисертація є сучасним науковим дослідженням у галузі біології, зокрема клітинної, молекулярної біології, генної та метаболічної інженерії та біотехнології мікроорганізмів. Робота спрямована на:

і) встановлення молекулярних механізмів, які керують деградацією цитозольних білків у промислово-важливих дріжджів, зокрема метилотрофних дріжджів

іі) розробку нових інструментів для експресії генів, а також генетичних і метаболічних маніпуляцій у таких дріжджів

ііі) конструювання більш ефективних оптимізованих продуцентів біопаливного етанолу 2-го покоління в нетрадиційних дріжджів.

Зазначені напрями є актуальними, відповідають критеріям наукової новизни в контексті сучасної біології та біотехнології.

Дисертація є добре інтегрованою в наукові напрями відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України, де вона була виконана.

В рамках роботи застосовано широкий спектр сучасних методів генної та метаболічної інженерії, клонування генів, біохімічні та мікроскопічні методи, а також методи класичної селекції мутантних штамів дріжджів.

Цілі та завдання роботи сформульовані чітко та логічно структуровані.

Дисертаційна робота створила нове наукове знання та має практичне значення, а також може стати основою майбутніх дослідницьких проєктів.

Дисертація містить стандартні структурні підрозділи: «Анотація», «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи дослідження», «Результати дослідження та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів», «Висновки» та «Список літератури», а також «Додаток 1» з описом публікацій за матеріалами роботи. Дисертація в сучасному вигляді викладена на 159 сторінках друкованого тексту, з яких основна частина праці займає 92 сторінки. Робота містить 22 рисунки, 5 таблиць. Список використаної літератури включає 224 літературних джерела. Дисертація містить теоретико-методологічні положення та висновки, сформульовані здобувачем, і таким чином відповідає необхідним стандартам структури та форматування.

Результати дисертаційної роботи опубліковано в 3-ох наукових статтях з наукометричної бази даних Scopus (одна, де здобувачка є першим автором), які включали публікації у відомих наукових виданнях, таких як Yeast і Microbial Cell Factories. Особистий внесок автора солідний і суттєвий. Результати також були представлені на кількох наукових конференціях.

Робота загалом написана добре, деякі незначні чи сумнівні синтаксичні помилки вказав у тексті. Зупинюся на кількох більш загальних питаннях.

Огляд літератури є досить обширним і включає навіть підрозділи, що стосуються мітофагії, рибофагії або CVT шляху, які фактично не розглядаються в експериментальній частині, і, можливо, можуть бути скорочені. Більше даних, якщо вони могли б бути включені, були б корисними щодо механізмів деградації фруктозо-1,6-бісфосфатази в Saccharomyces cerevisiae, або про те, чи деякі структурні сигнали в цитозольних білках, які

регулюють їхню стабільність, як то убіквітування, аргінілювання, SUMO-лювання, або інші вторинні модифікації, залучені до лізосомо-залежних шляхів.

Розділ «**Аналіз та узагальнення**» повторює багато експериментальних чи літературних деталей, які можна опустити або скоротити. Незважаючи на те, що ця робота складається з трьох позірно незалежних ліній експериментів або експериментальних цілей, вони, незважаючи на це, очевидно є пов'язаними, оскільки нові генетичні інструменти, що підтримують продукцію рекомбінантного білка (маніпуляції з аутофагійними механізмами зокерма), нові селективні маркери (які допомагають уникнути використання генів стійкості до антибіотиків) і пошук підсилювачів алкогольного бродіння серед білків-сенсорів, – усе це поєднується та веде до нових можливостей для створення більш стабільних та продуктивніших штамів-ферментерів. На цьому слід чіткіше наголосити в цьому аналітичному розділі дисертаційної роботи.

Загальне зауваження: у тексті дисертаційної роботи рекомендую додати ряд так званих перехресних посилань, тобто посилань на попередні малюнки та розділи роботи, де представлені обговорювані експериментальні дані. Наприклад, це стосується розділів «Результати», «Аналіз і Узагальнення».

У мене немає суттєвих зауважень до обширних «**Матеріалів і методів**», а також до «**Висновків**», які добре сформульовані.

Варто наголосити на наступному важливому аспекті цієї праці. Ця дисертація вимагала інтенсивної та ретельної експериментальної роботи, оскільки, наприклад, для виділення так званих MNNG-резистентних мутантів потрібно було проаналізувати багато тисяч колоній дріжджів. Застосований підхід передбачав негативний відбір і вимагав багато часу для його виконання. Багато векторів, побудованих у рамках цієї роботи, також вимагали терпіння та скрупульозної уваги до деталей. Слід також зазначити, що ця робота базувалася на багатьох попередніх проектах та попередніх цікавих даних, отриманих у закордонних наукових групах, а також у цьому Інституті, зокрема у відділі молекулярної генетики та біотехнології.

Однак виникло також декілька зауважень чи запитань до роботи:

1. «**Анотація**»: «*Кілька разів у тексті згадується або зазначається, що «Крім того, біомаса мутантних штамів була значно зменшена порівняно з батьківським штамом, що вказує на порушення автофагії*» — Крім загальної або неселективної аутофагії, може бути багато інших причин, чому швидкість росту будь-якого мутантного або рекомбінантного штаму знижується. Це справедливо для мутантів з дефіцитом вакуолярних протеаз (останні етапи загальної автофагії) навіть у багатому середовищі. Але чи вірне відповідне твердження для мутантів з пошкодженням будь-якого відомого *ATG* гена, який бере участь у коровому механізмі автофагії?

2**. «Результати досліджень та їх обговорення». Розділ 3.1.1** Скринінг мутантів, з пошкодженою деградацією β-галактозидази у метилтрофних дріжджів *Komagataella phaffii*. Коли кінетику β-галактозидази під промотором гена FLD аналізували після переносу клітин на середовище з глюкозою протягом 18 годин, ізольовані мутанти MNNG демонстрували різну залишкову активність ферменту, але водночас рівномірний уповільнений ріст на глюкозі. Одночасно у мутантів MNNG 1 і 3 виявлено більш виражене порушення деградації β-галактозидази, тоді як у мутантів MNNG 2 та 4 – лише «частковий» мутантний фенотип. Якою мірою уповільнений ріст на глюкозі порівняно з контролем штаму дикого типу міг вплинути на спостережуваний фенотип?

3. Який відсоток ідентифіковані MNNG мутанти становили від усіх проаналізованих мутагенізованих колоній?

4. Оскільки два мутанти з чотирьох продемонстрували явний дефект пексофагії, але при цьому всі ізольовані MNNG мутанти виявили також явний дефіцит загальної автофагії (як у тесті з Phloxin-B), чи існують інші приклади з літератури, коли atg мутанти (ті, що виявляють

дефіцит загальної або «корової» неселективної аутофагії) не виявдяють одночасно порушення пексофагії, як показано на прикладі MNNG мутантів 2 та 4?

5. У **підрозділі 3.2.1.** «Відбір штамів *O. polymorpha*, стійких до ауреобазидину». **Рисунок 3.8.** Чому для мутагенезу було обрано положення неконсервативної амінокислоти A/G157 у послідовності гена *AUR O. polymorpha*, а не наступний консервативний залишок фенілаланіну F? При цьому саме заміна у позиції 157 дала бажаний очікуваний фенотип, а не дві інші мутації в N-кінцевій ділянці відповідного білка, чи маєте пояснення?

6. У підрозділі 3.2.3. «Конструювання штамів *O. polymorpha* із надекспресією *TAL1*, *TKL1* та *AOX1*, будь ласка, надайте пояснення, чому була обрана ця потрійна комбінація генів?

Інші технічні зауваження та пропозиції були вказані у тексті роботи.

У результаті проведеного аналізу вважаю, що дисертаційна робота **Зуо Мінсін «Регуляція деградації β-галактозидази та метаболічна інженерія ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*»** за актуальністю, новизною результатів, науково-практичною цінністю та обґрунтованістю відповідає «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. №261, наказу МОН України №40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», пп. 6, 7, 8 «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 січня 2022 р. та відповідає напрямку наукового дослідження освітньо-наукової програми Інституту біології клітини НАН України з галузі знань 09 – Біологія зі спеціальності 091 – Біологія. Зуо Мінсін заслуговує на присудження ступеня доктора філософії.

Завідувач відділу сигнальних механізмів клітини
Інституту біології клітини НАН України,
доктор біологічних наук, старший дослідник Олег СТАСИК

1 квітня 2025 р.