

Рішення
разової спеціалізованої вченої ради
про присудження ступеня доктора філософії

Здобувачка ступеня доктора філософії - Мінсін Зуо,
1991 року народження, громадянка Китайської Народної Республіки,
освіта вища: закінчила у 2016 році Хунанський нормальний університет
за спеціальністю мікробіологія,
навчається в аспірантурі в Інституті біології клітини Національної академії наук
України, м. Львів,
виконала акредитовану освітньо-наукову програму «Освітньо наукову
програму» Інституту біології клітини НАН України.

Разова спеціалізована вчена рада, утворена наказом Інституту біології
клітини Національної академії наук України, м. Львів від «28» лютого 2025 року
№ 15/ОД, у складі:

Голови разової
спеціалізованої вченої ради – Михайло Гончар, доктор біологічних наук,
професор, член-кореспондент НАН України, завідувач відділу аналітичної
біотехнології, Інститут біології клітини Національної академії наук України

Рецензентів - Олег Стасик, доктор біологічних наук, старший дослідник,
завідувач відділу сигнальних механізмів клітини, Інститут
біології клітини Національної академії наук України

Галина Гайда, кандидат хімічних наук, старший науковий
співробітник, старший науковий співробітник відділу
аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини
Національної академії наук України

Офіційних опонентів - Олена Кравець, доктор біологічних наук, старший
науковий співробітник, головний науковий співробітник
відділу геноміки та молекулярної біотехнології, Державна
установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»

Валерій Філоненко, доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України, завідувач відділу сигнальних
систем клітини, Інститут молекулярної біології і генетики
Національної академії наук України,

на засіданні «24» квітня 2025 року прийняла рішення про присудження ступеня
доктора філософії з галузі знань 09 – біологія Мінсін Зуо
на підставі публічного захисту дисертації «Регуляція деградації β -галактозидази та
метаболічна інженерія ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів
Komagataella phaffii та *Ogataea polymorpha*» за спеціальністю 091 – біологія.

Дисертацію виконано в Інституті біології клітини Національної академії наук України, м. Львів.

Науковий керівник - Андрій Сибірний, доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, Інститут біології клітини Національної академії наук України, директор.

Дисертацію подано у вигляді спеціально підготовленого рукопису англійською мовою, який повністю відповідає вимогам до оформлення дисертації, затвердженим Наказом МОН України від 12.01.2017 р., № 40.

Здобувачкою було проведено хімічний мутагенез клітин дріжджів *Komagataella phaffii* із використанням N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (MNNG), запропоновано оригінальний метод селекції та виділено унікальну колекцію мутантів із дефектами деградації рекомбінантної β -галактозидази, з метою встановлення механізмів генетичної регуляції гомеостазу цитозольних білків. Встановлено, що окремі мутанти виявляють пошкодження механізмів загальної неселективної автофагії, але лише окремі з них – пошкодження механізму специфічної автофагії пероксидом (пексофагії). Встановлення генетичної природи відповідних мутацій відкриє нові перспективи для оптимізації систем експресії рекомбінантних білків у дріжджів.

Уперше запропоновано використання генетично-інженерних маркерів *AUR1* і *IMH3* для позитивної селекції трансформантів та кількості етапного конструювання рекомбінантних штамів *Ogataea polymorpha*. Це надає додаткові ефективні засоби для створення прототрофних промислових генно-інженерних штамів дріжджів із бажаними фізіологічними характеристиками.

Вперше встановлено регуляторну роль сенсора гексоз *HXS1* та транскрипційного фактора *AZF1* у процесах ферментації ксилози та глюкози в *O. polymorpha*. Доведено, що їхнє надекспресування у штамі дикого типу та покращеному продуценті етанолу *BEP/ Δ cat8* сприяє підвищенню виходу етанолу, особливо з ксилози. Ці результати є перспективними для розробки більш ефективних продуцентів етанолу з лігноцелюлозних гідролізатів.

Результати цієї роботи мають вагоме значення для біотехнології, оскільки сприяють розумінню регуляторних механізмів автофагійної деградації білків, вдосконаленню систем експресії білків у метилотрофних дріжджів, розширюють можливості генетичної модифікації цих організмів, та сприяють розробці ефективних методів отримання біоетанолу з дешевої лігноцелюлозної сировини.

Отримані результати можуть слугувати теоретичною основою для підготовки фахівців у галузі мікробних біотехнологій та практичною основою для подальшої оптимізації продуцентів рекомбінантних білків і біопаливного етанолу у метилотрофних дріжджів.

Здобувачка має 7 наукових публікацій за темою дисертації, з них 3 статті у наукових фахових виданнях, що входять до WoS або Scopus, 4 тези доповідей в збірниках матеріалів конференцій:

1. **Zuo M**, Dmytruk OV, Dmytruk KV, Kang YQ, Sibirny AA. (2025). Isolation of mutants defective in cytosolic β -galactosidase degradation in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*. *Cytology and Genetics*, 59(1):71–78. <https://doi.org/10.3103/S0095452725010104>. **Q4**, Scopus, WoS. (Здобувачка разом із співавторами проводила дослідження, аналізувала та узагальнювала отримані дані, брала участь у написанні статті).

2. Semkiv MV, Ruchala J, Tsaruk AY, Zazulya AZ, Vasylyshyn RV, Dmytruk OV, **Zuo M**, Kang YQ, Dmytruk KV, Sibirny AA. (2022). The role of hexose transporter-like sensor HXS1 and transcription activator involved in carbohydrate sensing AZF1 in xylose and glucose fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. *Microbial Cell Factories*, 21, 162. doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01889-z>. **Q1**, Scopus, WoS. (Здобувачка разом із співавторами проводила дослідження, аналізувала та узагальнювала отримані дані, брала участь у написанні статті).

3. Bratiichuk D, Kurylenko O, Vasylyshyn RV, **Zuo M**, Kang YQ, Dmytruk K, Sibirny AA. (2020). Development of new dominant selectable markers for the nonconventional yeasts *Ogataea polymorpha* and *Candida famata*. *Yeast*, 37(9-10):505-513. **Q2**, Scopus, WoS. doi: <https://doi.org/10.1002/yea.3467>. (Здобувачка разом із співавторами проводила дослідження, аналізувала та узагальнювала отримані дані, брала участь у написанні статті).

У дискусії взяли участь (голова, рецензенти, офіційні опоненти, інші присутні) та висловили зауваження:

Рецензент – Олег Стасик, доктор біологічних наук, старший дослідник, завідувач відділу сигнальних механізмів клітини, Інститут біології клітини Національної академії наук України, надав позитивну рецензію із зауваженнями та запитаннями:

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 із пошкодженою деградацією β -галактозидази у метилотрофних дріжджів *Komagataella phaffii*. Коли кінетику активності 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 аутофагії (як у тесті з PhloxinB), чи існують інші приклади з літератури, коли atg мутанти (ті, що мають дефіцит загальної або «корової» неселективної аутофагії) не виявляють 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 потрібна комбінація генів?

Галина Гайда, кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник, старший науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини Національної академії наук України, *надала позитивну рецензію із зауваженнями та рекомендаціями:*

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, рисунки 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 рисунку 3.3)? Було б корисно оцінити життєздатність клітин у цьому експерименті для більш точної інтерпретації отриманих результатів, зокрема щодо потенційної гетерогенності культури, що може впливати на достовірність даних.

4). Сторінка 92. Поясніть, 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 плазмідні 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 штамів?

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 передують 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.

С.12: мутанти з дефектною в деградацією; отримано інсерційнийого мутанта;

С.18: надпродуцентів.

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

Опонент – Олена Кравець, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, головний науковий співробітник відділу геноміки та молекулярної біотехнології, Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», *надала позитивний відгук із зауваженнями:*

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.

Валерій Філоненко, доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, завідувач відділу сигнальних систем клітини, Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, *надав позитивний відгук із зауваженнями:*

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*, **рисунок 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, **рисунок 3.8** - Яким було обґрунтування введення цілеспрямованих точкових мутацій у ген *AUR1* 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.

Голова разової ради – Михайло Гончар, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України, завідувач відділу аналітичної

біотехнології, Інститут біології клітини Національної академії наук України.
Оцінка позитивна, без зауважень.

Андрій Сибірний - директор Інституту біології клітини, доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, директор, Інститут біології клітини Національної академії наук України. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Результати відкритого голосування:

«За» 5 членів ради,
«Проти» 0 членів ради.

На підставі результатів відкритого голосування разова спеціалізована вчена рада присуджує Мінсін Зуо ступінь доктора філософії з галузі знань 09 – біологія за спеціальністю 091 – біологія.

Відеозапис трансляції захисту дисертації додається.

Голова разової спеціалізованої
вченої ради


(підпис)

Михайло ГОНЧАР
(власне ім'я та прізвище)

Підпис Гончара М.
ЗАСВІДЧУЮ



Учений секретар
Інституту біології клітини НАН України, к.б.н.


Барська М.Л.