

ЗАТВЕРДЖУЮ
Заступник директора Інституту біології клітини
НАН України з наукової роботи
Д.б.н., член-кор. НАН України
Костянтин ДМИТРУК
"25" лютого 2025 р.



ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів
дисертації Мінсін ЗУО (Mingxing ZUO) на тему:
**«Регуляція деградації β -галактозидази та метаболічна інженерія
ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів *Komagataella phaffii* та
Ogataea polymorpha»** («Regulation of β -galactosidase degradation and
metabolic engineering of xylose fermentation in the methylotrophic yeasts
Komagataella phaffii and *Ogataea polymorpha*»), поданої на здобуття
ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія
за спеціальністю 091 – Біологія
наукового семінару відділу аналітичної біотехнології
та відділу молекулярної генетики та біотехнології
Інституту біології клітини Національної академії наук України
від 17 лютого 2025 року

Дисертаційна робота виконана у відділі молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України, науковий керівник доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, директор, завідувач відділу молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України Сибірний Андрій Андрійович.

1. Актуальність теми дослідження

Дисертаційна робота є сучасним науковим дослідженням у галузі клітинної, молекулярної біології, генної та метаболічної інженерії та біотехнології мікроорганізмів. Метилотрофні дріжджі, зокрема, *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*, є перспективними біотехнологічними об'єктами для промислового виробництва рекомбінантних білків, включаючи медично-важливі, такі як інсулін, інтерферони, вірусні антигени тощо. Завдяки високій швидкості росту біомаси, ефективній секреції білків і сильним індукованим промоторам, ці види дріжджів широко використовуються у фармацевтичній та біотехнологічній промисловості. Однак, одним із ключових обмежень їхнього використання є деградація рекомбінантних білків з цитозольною локалізацією, що знижує продуктивність системи. Особливо це стає критичним при зміні субстрату з метанолу на глюкозу, коли відбувається

катаболітна деградація білків, опосередкована системами убіквітин-протеасомного розщеплення та автофагії.

Попередні дослідження показали, що модифікація автофагійної деградації цитозольних білків може сприяти підвищенню продуктивності синтезу рекомбінантних білків у дріжджах. Проте механізми взаємозв'язку між автофагією та стабільністю рекомбінантних білків залишаються недостатньо вивченими. Ідентифікація задіяних генів відкриє нові можливості для оптимізації системи експресії гетерологічних білків на основі *K. phaffii*. Такі дослідження є важливим як для фундаментальної науки, так і для біотехнологічних застосувань.

Дисертаційне дослідження присвячене також розробці нових домінантних маркерів селекції для дріжджів *O. polymorpha*, як важливого інструменту генетичної та метаболічної інженерії. Оскільки генно-інженерні підходи активно застосовуються для конструювання нових штамів із модифікованими метаболічними шляхами, зростає потреба у додаткових селективних маркерах. У даній роботі були успішно протестовано мутантний ген *AUR1*, що забезпечує резистентність до антибіотика ауробазидину, та нативний ген *IMH3*, що забезпечує резистентність до мікофенолової кислоти, як потенційні маркери для генетичної інженерії *O. polymorpha*.

Ще одним важливим аспектом роботи є оптимізація процесу ферментації ксилози для виробництва біоетанолу з лігноцелюлозної біомаси. Проблема енергетичної безпеки та пошук альтернативних джерел палива є однією з глобальних викликів сучасності. Дріжджі *O. polymorpha* демонструють перспективність як продуценти біоетанолу, оскільки здатні ферментувати ксилозу за підвищених температур. Проте обмежене розуміння регуляторних механізмів цього процесу перешкоджає подальшому покращенню продуктивності. Було досліджено роль сенсорів цукрів та транскрипційних факторів у ферментації ксилози в *O. polymorpha*, та встановлено нові молекулярно-генетичні підходи для створення більш ефективних штамів-продуцентів біоетанолу.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Тема дисертації відповідає науковому напрямку досліджень відділу молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України, а саме одержання біопаливного етанолу шляхом ферментації лігноцелюлозних гідролізатів неконвенційними дріжджами.

Дисертація виконана в межах науково-дослідних програм «Президентські дискреційні гранти підтримки України» (“Presidential Discretionary-Ukraine Support Grants”) від Simons Foundation, проєктів № 1030281 та № 1290613; Китайсько-українського проєкту міжурядового обміну (№8); гранту Національного фонду природничих наук Китаю (NSFC; № 32060034/№ 32460051). Дослідження також фінансувалися China Scholarship Council (№ 201908520075).

3. Наукова новизна отриманих результатів.

Здобувачкою було проведено хімічний мутагенез клітин дріжджів *K. 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 *O. 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 *BER/ Δ cat8* сприяє підвищенню виходу етанолу, особливо з ксилози. Ці результати є перспективними для розробки більш ефективних продуцентів етанолу з лігноцелюлозних гідролізатів.

4. Теоретичне та практичне значення результатів дисертації

Результати цієї роботи мають вагомe 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.

5. Використання результатів роботи

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

6. Особиста участь автора в отриманні наукових та практичних результатів, що викладені в дисертаційній роботі

Планування проведення досліджень для виконання завдань було виконано аспіранткою спільно із науковим керівником. Основну частину експериментальної роботи дисертантка виконала самостійно, а також сформулювала основні висновки та провела статистичний аналіз одержаних результатів. Аспірантка та науковий керівник спільно проаналізували результати експериментальних досліджень та підготували наукові публікації

на їх основі. Використані в дисертації ідеї, положення чи гіпотези інших авторів мають відповідні посилання і використані лише для підкріплення ідей здобувачки.

7. Перелік публікацій за темою дисертації із зазначенням особистого внеску здобувача.

За результатами досліджень опубліковано 7 наукових праць, у тому числі 3 статті у наукових фахових виданнях, що входять до WoS або Scopus), 4 тези доповідей в збірниках матеріалів конференцій.

Список опублікованих праць за темою дисертації:

Статті у виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core або Scopus:

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).

Тези доповідей в збірниках матеріалів конференцій:

4. **Zuo M**, Dmytruk OV, Dmytruk KV, Sibirny AA. Searching the gene involved in the autophagy of cytosolic and peroxisomal proteins in methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*. // Conference of Young Scientists. May 20, Lviv, Ukraine. – 2024. – P.3.

5. **Zuo M**, Dmytruk OV, Dmytruk KV, Sibirny AA. Screening for mutant strains with autophagy defects of cytosolic protein β -galactosidase in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*. // 7th Congress of the All-Ukrainian public organization «Ukrainian Society of Cell Biology» with international representation. September 11-13, Lviv, Ukraine. – 2024. – P.29.

6. **Zuo M**, Vasylyshyn RV, Sibirny AA. The role of transcription activator involved in carbohydrate sensing *azf1* in xylose and glucose fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. // Conference of Young Scientists of Institute of Cell Biology, June 8, Lviv, Ukraine. – 2022. – P.19.

7. **Zuo M**, Vasylyshyn RV, Sibirny AA. Improvement of alcoholic fermentation in yeast by protoplast fusant of *Saccharomyces cerevisiae* and *Ogataea polymorpha* strains. // 1st International conference of young scientists of the Institute of Cell Biology and the University of Rzeszów “Current Issues in Cell Biology and Biotechnology”, June 6, Lviv, Ukraine. – 2021. – P. 24.

8. Розглянувши звіт подібності щодо перевірки на плагіат, рецензенти дійшли висновку, що дисертаційна робота **Мінсін ЗУО (Mingxing ZUO)** є результатом самостійних досліджень здобувача і не містить елементів плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають посилання на відповідне джерело. Робота містить теоретичні та методичні положення і висновки, сформульовані дисертанткою особисто. Дисертація характеризується єдністю змісту та відповідає вимогам щодо її оформлення.

9. Структура та обсяг дисертації

Дисертація містить наступні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати дослідження та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додаток 1». Дисертацію викладено на 160 сторінках. Робота містить 22 рисунки, 5 таблиць, 1 формулу. Список використаної літератури включає 229 літературних джерел.

10. Оцінка мови та стилю дисертації. Дисертація виконана фаховою англійською мовою, текстове подання матеріалу відповідає стилю науково-дослідної літератури. Дисертація за структурою, мовою та стилем викладення відповідає вимогам МОН України.

У результаті попередньої експертизи дисертації **Мінсін ЗУО (Mingxing ZUO)** на тему: **«Регуляція деградації β-галактозидази та метаболічна інженерія ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*»** («Regulation of β-galactosidase degradation and metabolic engineering of xylose fermentation in the methylotrophic yeasts *Komagataella phaffii* and *Ogataea polymorpha*») і повноти публікації основних результатів дослідження

УХВАЛЕНО:

1. Констатувати, що дисертаційна робота **Мінсін ЗУО (Mingxing ZUO)** на тему: **«Регуляція деградації β-галактозидази та метаболічна інженерія ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів *Komagataella phaffii* та**

Ogataea polymorpha» («Regulation of β -galactosidase degradation and metabolic engineering of xylose fermentation in the methylotrophic yeasts *Komagataella phaffii* and *Ogataea polymorpha*»), яка подана на здобуття ступеня доктора філософії, за своїм науковим рівнем та практичною цінністю, ступенем наукової новизни, обґрунтованістю, змістом та оформленням повністю відповідає вимогам **«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, 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 від 12 січня 2022 р. № 44, вимогам наказу МОН України №40 від 12.01.2017 **«Про затвердження Вимог до оформлення дисертації»** та відповідає напрямку наукового дослідження освітньо-наукової програми Інституту біології клітини НАН України з галузі знань 09 – Біологія зі спеціальності 091 – Біологія.

2. Рекомендувати дисертацію **МінсінгЗУО (Mingxing ZUO)** на тему:**«Регуляція деградації β -галактозидази та метаболічна інженерія ферментації ксилози у метилотрофних дріжджів *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha*»** («Regulation of β -galactosidase degradation and metabolic engineering of xylose fermentation in the methylotrophic yeasts *Komagataella phaffii* and *Ogataea polymorpha*») до захисту на здобуття ступеня доктора філософії у разовій спеціалізованій вченій раді з галузі знань 09 – Біологія зі спеціальності 091 – Біологія.

3. Рекомендувати Вченій раді Інституту біології клітини НАН України відповідно до п.15 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 від 12 січня 2022 р. № 44 затвердити такий склад разової спеціалізованої вченої ради:

Голова ради:

Гончар Михайло Васильович, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України, завідувач відділу аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини Національної академії наук України.

Рецензенти:

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

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

Офіційні опоненти:

Кравець Олена Адольфівна, 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».

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

За затвердження висновку проголосували:

«за» – *сімнадцять осіб*,

«проти» – *немає*,

«утримались» – *немає*.

Головуючий на науковому семінарі,
д.б.н., професор, член-кор. НАН України,
зав. відділу регуляції
проліферації клітин і апоптозу



Ростислав СТОЙКА

Рецензенти

к.х.н., ст.н.с.,

старший науковий співробітник
відділу аналітичної біотехнології



Галина ГАЙДА

д.б.н., ст. дослідник
завідувач відділу сигнальних
механізмів клітини



Олег СТАСИК

Відповідальна особа за атестацію PhD

і забезпечення діяльності спеціалізованих вчених рад
з присудження ступенів доктора філософії,
к.б.н.



Наталія ФІНЮК

"25" лютого 2025 р.

*Ростислав Стойка Р.,
Гайда Г.,
Стасик О.,
Фінюк Н.
Засвідчує*

Учений секретар
ІБК НАН України, к.б.н.

 Барська М.Л.

