

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Гусятинера Михаила Марковича на тему: «Создание продуцентов аминокислот на основе бактерий *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*; исследование механизмов продукции», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – «Генетика».

Актуальность темы диссертационной работы

С шестидесятых годов прошлого века началось производство природных форм аминокислот с помощью микроорганизмов вместо ранее существующих методов химического синтеза, дававших в результате смесь природных L-форм с D-формами, которые не усваиваются живыми организмами. Вначале использовались выделенные из природы микробы, которые могли накапливать в культуральных средах в основном глутаминовую кислоту, которая сразу же нашла широкое применение, как вещество, улучшающее вкус пищи, бедной по вкусу. Поскольку корма для сельскохозяйственных животных как правило содержат недостаточное количество некоторых незаменимых аминокислот, то это замедляло синтез белка, привесы и снижало эффективность усвоения таких кормов. Встал вопрос об аминокислотных добавках в корма с целью повышения эффективности кормов в плане усиления синтеза белка. Для решения этого вопроса возникла необходимость генетической модификации природных форм микроорганизмов с целью перестройки их метаболизма в направлении продукции целевой аминокислоты. Успехи в решении этой задачи позволили начать производство L-лизина, наиболее дефицитной в кормах аминокислоты. В частности, на территории СССР работали заводы, выпускающие лизин для нужд сельского хозяйства, который получали с помощью мутантных штаммов, полученных на основе природных глутаматпродуцирующих микроорганизмов. В настоящее время усилия генетиков направлены на создание продуцентов практически всех остальных аминокислот, входящих в состав белков. Их применение не ограничивается

добавками в пищу человека и в корма для скота – они используются в медицине, в косметике, в качестве сырья для синтеза в фармацевтике. Сейчас ведется разработка искусственной пищи, в основе которой будут белки, синтезируемые *ин витро* из аминокислот. В будущем, вероятно, сократится или даже полностью прекратится выращивание сельскохозяйственных животных на мясо. Исследование М.М.Гусятинера, посвященное проблеме конструирования микробных продуцентов аминокислот, несомненно является очень актуальным сейчас и полезным для будущих работ в этом направлении.

Общие сведения о диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и списка литературы (цитировано 332 источника). Она содержит 262 страницы текста, 25 таблиц и 60 рисунков. По теме диссертации опубликовано 29 печатных работ, включая 11 российских и международных патентов на изобретения.

В обзоре литературы (глава 1) автор всесторонне анализирует генетические и молекулярно-биологические особенности микроорганизма *Corynebacterium glutamicum* – выделенного из природы продуцента глютаминовой кислоты. Основное внимание уделено механизму продукции глютаминовой кислоты этим микроорганизмом, проблеме, которая интенсивно исследуется до настоящего времени и которая, несмотря на многочисленные исследования, до конца не разрешена. Этот обзор может быть использован как наиболее полный источник соответствующей информации при создании новых продуцентов аминокислот и белков, поскольку *C. glutamicum* по-прежнему является основной платформой для конструирования таких продуцентов как в России, так и за рубежом.

В главе 3, (разделы 3.1-3.4) приводятся экспериментальные данные по созданию новых селекционно-генетических методов работы с *C. glutamicum*, и по созданию на его основе продуцентов фенилаланина с анализом биохимических механизмов продукции этой аминокислоты.

Раздел 3.5 посвящен биохимическим путям деградации треонина культурой *E.coli*. Исследование привело к обнаружению гена, контролирующего первый этап деградации треонина и его транспозонному блокированию. На основе штаммов с блокированной деградацией треонина создано новое поколение продуцентов этой аминокислоты со значительно улучшенными свойствами.

Раздел 3.6 касается исследованию биосинтеза цистеина. На основе собственных и литературных данных показано неизбежное накопление альфа-гидроксиглутаровой кислоты в ходе синтеза серина, предшественника цистеина клетками *Escherichia coli* и родственными бактериями. Описана методика получения мутантного фермента, О-серинацетилтрансферазы, освобожденного от ингибирования конечным продуктом, основанная на модификациях активного центра фермента, приводящих к снижению связывания им ингибитора (цистеина), но сохраняющего способность связывать его субстрат (серин). На основе сконструированных мутаций создан промышленный продуцент цистеина.

В заключении диссертации приведены основные результаты работы, выводы и рекомендации по использованию результатов.

Научная новизна и практическая значимость работы

Обладают новизной следующие предложенные авторам генетические и биотехнологические методы, а также научные достижения.

- Модификация ранее известного метода пенициллинового обогащения негативными мутантами применительно к глутаматпродуцирующей бактерии *C.glutamicum*
- Обработка антибиотиком грамицидин С культуры *C.glutamicum* для определения свойств лабильных белков-ферментов
- метод получения гамма-аминомасляной кислоты клетками *E.coli* без выделения и очистки соответствующего фермента

- Автором впервые объяснен механизм продукции фенилаланина мутантами *C.glutamicum*, предусматривающий неферментативное превращении предшественника тирозина в фенилаланин.
- Впервые блокирован главный путь катаболизма треонина и картирован ген в хромосоме *E.coli*, ответственный за этот процесс. Соответствующая мутация перенесена в продуценты треонина, значительно улучшившая их производственные показатели.
- Впервые получены мутации, вызывающие нарушения ретроингибирования цистеином фермента О-серинацетилтрансферазы, на основании анализа объемной структуры каталитического центра этого фермента. Мутации успешно использованы в промышленных продуцентах цистеина.
- Выдвинута новая гипотеза о работе фермента 3-фосфоглицератдегидрогеназы в кишечной палочке и родственных микробах, которая объясняет механизм побочной продукции альфа-гидроксиглутаровой кислоты.

Научную значимость результатов исследования, помимо указанных выше, представляют также обоснованная экспериментами схема катаболизма аминокислоты треонин бактерией *Escherichia coli*, по которой треонин превращается в глицин одновременно двумя путями – с участием треониндегидрогеназы и серинтрансгидроксиметилазы. Автором методами биоинформатики идентифицирован универсальный регуляторный домен, обуславливающий ингибирование фенилаланином фермента биосинтеза этой аминокислоты – префенатдегидратазы в клетках *Corynebacterium glutamicum*. Выявлена также аминокислотная замена в этом домене, приводящая к полной утрате его регуляторной функции. Научную ценность представляет обнаруженный автором катаболизм фенилаланина этим промышленно значимым микроорганизмом. Интересно также, что этот катаболизм инициируется одним из ферментов синтеза другой ароматической аминокислоты, тирозина. Определенный вклад в знание о процессах

переноса веществ в клетки бактерий вносят установленные автором белки-переносчики серосодержащих молекул, родственных цистеину.

Достоверность результатов и выводов данной диссертационной работы не вызывает сомнений. Автореферат соответствует тексту диссертации.

В качестве **замечаний** можно отметить следующее.

1. Литературный обзор посвящен только одному из объектов исследования, микроорганизму *C. glutamicum*, тогда как исследование проводились также и на кишечной палочке. Было бы, вероятно, целесообразно дать необходимую информацию, касающуюся второго микроорганизма, сократив обзор по первому микроорганизму.
2. Автором обнаружена деградация фенилаланина клетками *C. glutamicum*, и на основании генетических и биохимических соображений предположена структура продукта деградации. Было бы целесообразным идентифицировать этот продукт современными химическими методами и более убедительно показать правильность высказанной гипотезе о структуре этого вещества.
3. Несмотря на то, что выдвинутая авторам гипотеза о неизбежности продукции альфа-гидроксимасляной кислоты в ходе биосинтеза серина в клетках *E. coli*, представляется убедительной, все же необходимы и вполне возможны дополнительные эксперименты, подтверждающие высказанную гипотезу.

Тем не менее, данные замечания не ставят под сомнение достоверность результатов диссертации и не умаляют высокого научного уровня и значимость работы.

Заключение

Диссертация Гусятинера Михаила Марковича на тему «Создание продуцентов аминокислот на основе бактерий *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*; механизмов продукции», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности

03.02.07 – «Генетика» является научно-квалификационной работой, на основании которой разработаны положения, совокупность которых можно считать научным достижением в области генетики и селекции микробных продуцентов аминокислот.

По своей актуальности, новизне, научно-практическому значению данная диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук согласно п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016), а сам автор Гусятинер Михаил Маркович достоин присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 «генетика».

Заместитель директора ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН», доктор биол. наук профессор

С.К. Абилов

119991, ГСП-1 М

Телефон: (499)13

e-mail: abilev@vigg

« 16 » июля,

Подпись Серикбая

Ученый секретарь

РАН» доктор биол.

ЕРЯЮ

генетики им. Н.И. Вавилова



Огаркова Ольга Александровна

СВЕДЕНИЯ

об оппоненте по докторской диссертации **Гусятинера Михаила Марковича** на тему: «Создание продуцентов аминокислот на основе бактерий *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*; исследование механизмов продукции» по специальности 03.02.07 – «Генетика».

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы	Ученая степень, звание	Шифр специальности	Основные научные труды
Абилев Серикбай Каримович	РФ	Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Институт общей Генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии наук	Доктор биологических наук, профессор	03.00.15 Генетика	1.Игонина Е.В., Марсова М.В., Абилев С.К. Lux-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность //Экологическая генетика. -2016. №4. С.52-62. Doi:10.1781/ecogen14452-62. 2. Ловинская А.В., Колумбаева С.Ж., Коломиец О.Л., Абилев С.К. Генотоксическое действие пестицида фипронила на соматические и генеративные клетки мышей// Генетика. 2016. т.52. с.561-568. DOI: 10.7868/S0016675816050076 3. Аверина О.В., Алексеева М.Г. Абилев С.К. , Ильин В.К., Даниленко В.Н. Распространение генов систем токсин-

					антитоксин семейства <i>trachea</i> и <i>gelbe</i> у бифидобактерий кишечной микрофлоры человека//Генетика. 2013. т.49. №3.с.315-344. 4. Абилов С.К. Глазер В.М. Генетическая токсикология: Итоги и проблемы// Генетика. 2013. т.49. № 1. с.81-93. DOI: 10.7668/S0016675813010025
--	--	--	--	--	---

Заместитель директора ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН» доктор биологических наук,
 профессор

Абилов

Адрес: 119991, ГСП-1, ул. Г.

« 2 » февраля 2018 г.

Подпись Серикбая Каримови

Ученый секретарь ФГБУН «И

. e-mail: abilev@vigg.ru



Вавилова РАН» доктор биологических наук,
 Омаркова Ольга Александровна