

ОТЗЫВ

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

Диссертация Гусятинера М.М. посвящена созданию микробных продуцентов аминокислот и исследованию генетического контроля их продукции, биохимическим особенностям этого процесса. Штаммы-продуценты являются основой промышленного производства аминокислот, которые необходимы в первую очередь в качестве добавок в корма сельскохозяйственных животных, а также в фармацевтике в качестве исходного материала, в виде смесей, применяемых в медицине и т.д. С каждым годом увеличивается мировое производство аминокислот как за счет введения новых производственных мощностей, так и благодаря улучшению свойств штаммов, их эффективности. В связи с этим тема исследования автора несомненно является актуальной и тесно связанной с производством важной отрасли народного хозяйства. Создание современных продуцентов на основе микроорганизмов требует использование глубоких знаний в области биохимии метаболизма, а также его генетического контроля и механизмов регуляции, чтобы перестроить метаболизм таким образом, чтобы микроорганизм направил максимум энергии на превращение субстрата (обычно углеводов) в единственный конечный продукт.

Научные положения, представленные автором к защите, не вызывают сомнений в их обоснованности. Их справедливость в большинстве случаев уже доказана на практике в ходе внедрения новых штаммов в промышленность в ряде стран. То же относится и к практическим рекомендациям автора настоящей диссертации. Научные гипотезы, выдвинутые автором, достаточно обоснованы собственным экспериментальным материалом и не противоречат данным научной литературы, с которой автор хорошо знаком.

Исследования автора всегда были направлены на создание новых, ранее неизвестных продуцентов ряда аминокислот на базе вида *Corynebacterium glutamicum*, который и ранее использовался в качестве исходного при создании продуцентов глютаминовой кислоты, лизина, пролина. Часть работы посвящена продуцентам на основе кишечной палочки *Escherichia coli*. Это микроорганизм стал также использоваться в качестве родительского при конструировании продуцентов аминокислот после пионерских работ по созданию продуцента треонина, несущего гибридную плазмиду, полученную методами генной инженерии, ранее не применяемой для подобных целей в мировой практике. В этой работе принимал активное участие автор диссертации, который и продолжил усовершенствование генно-инженерных продуцентов треонина, что описано в диссертации. Все исследования и их результаты, представленные в диссертации, обладают новизной и оригинальностью.

Научную значимость результатов исследования имеют следующие данные. На основании проведенных экспериментов впервые объяснен механизм продукции двух ароматических аминокислот – фенилаланина и тирозина, ауксотрофными и регуляторными мутантами *C. glutamicum*. Обнаружен ген, кодирующий фермент катаболизма треонина клетками *E. coli*, треониндегидрогеназу, и определено его положение на генетической карте этой бактерии. Продемонстрировано участие фермента серинтрансгидроксиметилазы в превращении треонина в глицин, а также дана относительная оценка интенсивности катаболизма треонина по двум обнаруженным путям: с участием треониндегидрогеназы и серинтрансгидроксиметилазы. Научный интерес представляет обоснованная автором гипотеза о механизме продукции альфа-гидроксимасляной кислоты ферментом серинового пути, 3-фосфоглицератдегидрогеназы (ген *serA*). Эта способность, как указано в диссертации, присуща двум бактериям семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* и *Pantoea ananatis*). В соответствии с выдвинутой гипотезой окисление 3-фосфоглицерата (метаболит гликолиза) происходит за счет восстановления альфа-кетоглутаровой кислоты (метаболит ЦТК) с образованием альфа-гидроксиглутаровой кислоты. Таким образом, фермент 3-фосфоглицератдегидрогеназа не является NAD-зависимой дегидрогеназой, а скорее относится к классу трансгидрогеназ, переносящих восстановительные эквиваленты с одного субстрата на другой. NAD участвует в этом процессе, но остается постоянно связанным с ферментом. Отсюда следует неизбежность сверхпродукции альфа-гидроксиглутаровой кислоты при сверхпродукции серина или цистеина

данными бактериями, что является важным следствием этой гипотезы с практической точки зрения при создании продуцентов серина, глицина и цистеина. Определенное научное значение имеют выявленные автором транспортеры предшественников цистеина и их генетическое детерминирование.

Значимость для практики имеет большая часть исследования автора, поскольку оно направлено на создание промышленных продуцентов аминокислот (гамма-аминомасляная к-та, фенилаланин, треонин, цистеин), которые уже нашли или, вероятно, найдут свое применение в промышленности. Определенное практическое значение имеют также методические приемы селекционной и биохимической работы с *C. glutamicum*. В частности, представляет интерес методики определения активности ферментов в клетках *C. glutamicum* без предварительного разрушения клеток, что позволяет измерять активность практически *in vivo*. Для пермеабилзации клеток предложен доступный антибиотик грамицидин С, который действовал практически мгновенно. При этом сохранялась, по-видимому, олигомерная структура ферментов, поскольку они сохраняли как активность, так и высокую чувствительность к аллостерическим ингибиторам. Вероятно, этот антибиотик можно применять с той же целью для родственных микроорганизмов, таких как возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* и др. Однако автор не провел соответствующего исследования, что можно считать недостатком данной работы. Научное и практическое значение исследований Гусятинера М.М. подтверждается также премией Правительства РФ в области науки и техники за разработку и внедрения производства аминокислот в 2011 г.

Диссертация объемом 262 стр. оформлена по соответствующим стандартам. Цитируется 332 литературных источника.

Материалы диссертации отражены в 29-ти печатных работах в ведущих отечественных и зарубежных научных журналах, а также в российских и зарубежных патентах на изобретения. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Заключение

Диссертация Гусятинера Михаила Марковича на соискание ученой степени доктора наук является научно-квалификационной работой, в которой на основе проведенных исследований разработаны научные положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение.

Решен ряд проблем биотехнологии, которые находят практическое применение. В соответствии с вышесказанным данная диссертационная работа соответствует п.7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 30.01.2002 г. № 74 (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 20.06.2011 г. № 475), а её автор Гусятинер Михаил Маркович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика».

Официальный оппонент,

Боронин Александр Михайлович

Член-корреспондент РАН, профессор,
доктор биологических наук,

Директор ФГБУ науки

Института биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук

*Подпись г.б.н., чл.корр.
чл.-корр. РАН А.М. Боронин*

*Ученый секретарь ЧБФМ
г.б.н.*

17.01.18



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 специального	Основные научные труды
Боронин Александр Михайлович	РФ	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов в им. Г.К. Скребина Российской академии наук	Доктор биологических наук, профессор член-корр. РАН	Генетика 03.02.07	1. Volkova O.V., Panov A.V., Kosheleva I.A., Boronin A.M. A new gene of TrfA type replication initiator found in a caprolactam/salicylate degradation plasmid pBS270 MOLECULAR BIOLOGY, V. 47, Issue: 2 Pages: 316-319 DOL: 10.1134/S0026893313020179 Published: MAR2013 Times Cited: 0 (from Web of Science) 2. T.Yu. Izmalkova, O.I. Sazonova, M.O. Nagornih, S.L. Sokolov, I.A. Kosheleva, A.M. Boronin The organization of naphthalene degradation genes in <i>Pseudomonas putida</i> strain AK5. Research in

					Microbiology, 2013, v. 164, p. 244-253. З. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Кошелева И.А., Борогин А.М. «Филогенетический анализ генов деградации нафталина и фенантрена у штаммов <i>Burkholderia</i> sp.» Генетика, 2013, т. 49, № 6, с. 703-711.
--	--	--	--	--	---

Заведующий лабораторией биологии плазмид ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.
Скрябина РАН (ИБФМ РАН)

Адрес: 142290 Пушкино, Московской обл. Проспект Науки, 5

тел.: 8 (495) 956-33-70

Адрес электронной почты: (e-mail): bogonin@ibp.m.pu.ru

Доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН

Борогин А.М.

Подпись д.б.н., профессора член-корр. РАН Борогина А.М.

Ученый секретарь ИБФМ РАН

д.б.н.

Решетилова Т.А.