

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы диссертации. Производство аминокислот – одна из главных отраслей современной биотехнологии. В мире производится более 6 млн. тонн различных аминокислот. Объем мирового рынка аминокислот постоянно увеличивается и, по прогнозам, к 2020 году достигнет 20 млрд. долларов. Использование аминокислот весьма разнообразно. Основная их часть используется в животноводстве – это кормовые аминокислоты лизин, треонин, метионин, триптофан. Другие аминокислоты используются в качестве усилителей вкуса (глутамат) и для синтеза заменителей сахара (фенилаланин, аспартат), а также служат сырьем для синтеза лекарственных препаратов, косметики и т.п. Смеси аминокислот применяются в медицине для парентерального питания, а также для питания спортсменов.

Почти все аминокислоты производят методом ферментации с использованием мутантных бактерий, обладающих способностью к их продукции. Данная диссертация посвящена конструированию таких продуцентов, мутационная перестройка которых направлена на приобретение бактерией способности производить и выделять в среду роста целевую аминокислоту. При создании продуцентов используется весь спектр самых современных генетических и генно-инженерных методов. Многие созданные автором штаммы нашли применение в промышленности как в нашей стране, так и за рубежом. В рецензируемой работе демонстрируется применение современных методов конструирования продуцентов аминокислот на ряде примеров создания востребованных промышленностью

штаммов-продуцентов. Таким образом, работа посвящена решению актуальных вопросов данной области биотехнологии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Научные положения, сформулированные в диссертации, основаны на фактическом материале данной работы, а также на большом объеме научной литературы (цитировано 332 источника). Научные гипотезы, а также практические рекомендации, сформулированные в диссертации, логично следуют из анализа экспериментальных данных диссертации.

Достоверность, новизна, значимость для науки и практики результатов исследований, описанных в диссертации. Достоверность результатов диссертации не вызывает сомнений в частности потому, что созданные автором генетические модификации и конструкции в бактериях, продуцирующих аминокислоты, используются и находят практическое применение в производстве аминокислот во многих странах мира. Все описанные в диссертации исследования находились на острие научных знаний о метаболизме бактерий и его генетическом контроле.

Большинство разработок автора защищены патентами и авторскими свидетельствами Российской Федерации и СССР и, естественно, удовлетворяют необходимыми критериями мировой новизны. Отметим, что Гусятинер М.М. является соавтором многих отечественных (более 100) и зарубежных патентов на изобретения. В частности, патентное ведомство США в период с 1981 года по настоящее время выдало 47 патентов с его соавторством. Все эти изобретения посвящены одной очень важной проблеме – созданию и усовершенствованию штаммов микроорганизмов, продуцентов аминокислот.

Практическое и теоретическое значение работ Гусятинера М.М. подтверждается присуждением ему в составе коллектива сотрудников премии Правительства Российской Федерации 2011 года в области науки и техники «За разработку и внедрение инновационных биотехнологических

процессов производства природных аминокислот для агропромышленного комплекса».

Оценка содержания диссертации. Диссертационная работа написана по традиционному плану (всего 262 стр.): Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Список литературы (цитировано 332 источника). Не нужно брать в кавычки?

Литературный обзор (94 стр.) посвящен механизму продукции глутаминовой кислоты её найденным в природе продуцентом *Corynebacterium glutamicum*. Глутаминовая кислота – первая из аминокислот, которую начали производить не химическим, а биотехнологическим способом, методом микробной ферментации. Обзор описывает историю изучения механизма продукции с последовательным применением все более глубоких и совершенных генетических и молекулярно-биологических методов. Несмотря на уже более чем полувековое исследование этой проблемы до сих пор остаются не ясными отдельные аспекты биохимии и молекулярной биологии микроорганизма, продуцирующего глутаминовую кислоту. Исследования в этой области продолжаются и сейчас, поскольку они важны также для создания продуцентов любых низкомолекулярных продуктов – аминокислот, нуклеиновых оснований, витаминов, антибиотиков и т.д.

Данный вопрос изложен в Обзоре весьма полно и интересно. Однако диссертационная работа посвящена не только микробным продуцентам аминокислот на основе *C. glutamicum*. Было бы целесообразным рассмотреть в Обзоре также и механизмы получения других аминокислот на основе иных продуцентов, в частности кишечной палочки, учитывая то, что основная часть исследований сделана автором именно на этом объекте. В этом случае, возможно, пострадала бы полнота и целостность главной темы Обзора – механизма продукции глутаминовой кислоты, но это облегчило бы понимание некоторых разделов «Экспериментальной части».

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из 6 разделов, в трех разделах объектом исследования является *C. glutamicum*, остальные разделы

посвящены *Escherichia coli*. Автором разработан и использован новый метод селекции негативных биохимических мутантов традиционного продуцента аминокислот *C. glutamicum*, а также метод мягкого разрушения барьера проницаемости этого микроорганизма, позволяющий быстро, а главное, не повреждая структуры олигомерных ферментов, оценивать степень их освобождения (за счет мутаций в аллостерических центрах) от ингибирования конечными продуктами. Изучение продукции аминокислоты фенилаланина клетками *C. Glutamicum*, описанное в четвертом разделе, привело, к обнаружению следующего феномена: нуждающиеся в тирозине мутанты, как убедительно показано автором, продуцируют не фенилаланин, как это считалось ранее, а предшественник тирозина – арогенат. Фенилаланин не продуцируется клетками, а образуется из арогената при слабом подкислении среды. Этот факт открывает возможность получения с помощью *C. glutamicum* фенилаланина, предусматривающую накопление арогената, который не ингибирует ароматические ферменты, а затем превращение его в фенилаланин в кислой среде.

Научный интерес вызывает регуляторная мутация, обнаруженная у полученного автором продуцента фенилаланина: точечная мутация находится в недавно обнаруженном широко распространенном регуляторном домене фермента. Обнаружение деградации фенилаланина и участие в этом процессе фермента пути биосинтеза тирозина – также существенная и абсолютно новая научная информация. Однако, по данному пути деградации фенилаланина, для большей убедительности, желательны дальнейшие исследования. Это касается в первую очередь химической идентификации первичного продукта деградации фенилаланина.

Исследования по деградации треонина у продуцентов на основе *E. coli* (пятый раздел эксперимент. части) имели как научное, так и очень большое практическое значение. Все современные продуценты треонина, используемые в мире в производстве этой аминокислоты, второй по дефицитности после лизина в кормах сельскохозяйственных животных, несут

мутации, блокирующие деградацию треонина. Ген *tdh*, контролирующей деградацию треонина на первом этапе, обнаружен, картирован, заблокирован, и этот блок перенесен в продуценты треонина, значительно усилив эффективность продукции этой аминокислоты. Всё это заслуга диссертанта.

В шестом разделе описаны исследования, посвященные созданию продуцентов цистеина, серусодержащей аминокислоты, имеющей широкое применение, промышленные продуценты которой в настоящее время находятся только в процессе разработки. Ряд важных научных вопросов, возникших в ходе конструирования продуцентов цистеина, получили ответы в данной диссертационной работе. Это касается биохимических механизмов и генетического контроля накопления побочных продуктов и биосинтетических предшественников цистеина клетками *E.coli*. Результатом исследования является, в частности, конструирование мутантов по ферменту, ингибируемому цистеином и регулируемому уровень его продукции. Ранее известные мутации, предохраняющие этот фермент (серин-*O*-ацетилтрансфераза) от ретроингибирования, приводили к резкому снижению его активности, поскольку ингибитор, цистеин, связывается с активным центром, который также взаимодействует с субстратом – серином, подобным цистеину по структуре. Для решения этой задачи была смоделирована структура активного центра и выбраны аминокислоты, замена которых может ослабить связь с ингибитором при сохранении взаимодействия с субстратом. С использованием сайт-специфического мутагенеза удалось путем аминокислотных замен создать активный центр серин-*O*-ацетилтрансферазы, который сохранил каталитическую активность, при этом потерял способность связывать ингибитор.

Материалы диссертации достаточно полно отражены в 29 печатных работах в ведущих отечественных и зарубежных научных журналах и патентах на изобретения. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Диссертация Гусятинера Михаила Марковича на соискание ученой степени доктора биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой, на основе проведенных исследований разработаны научные положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение. Решен ряд задач биотехнологии в области получения аминокислот, которые уже нашли практическое применение и будут использованы в будущем. В соответствии с вышеизложенным, 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».

Зав. лабораторией биотехнологии ИБХ
Доктор химических наук, академик РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. С

(ИБХ РАН);

117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ;

Телефон канцелярии: +7 (495) 335-01-00

Эл. почта: office@ibch.ru

Подпись академика РАН А.И. Мирошников
Ученый секретарь ИБХ РАН,
доктор физико-математических наук

25.01.2018

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации **Гусятинера Михаила Марковича** «Создание продуцентов аминокислот на основе бактерий *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*; исследование механизмов продукции»
представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.02.07 – «Генетика»

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы	Ученая степень, звание	Шифр специальности	Основные научные труды
Мирошников Анатолий Иванович	РФ	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемкина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук	доктор химических наук, академик	03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)	1 Fateev IV; Kharitonova MI; Antonov KV; Konstantinova ID; Stepanenko VN; Esipov RS; Seela F; Tembutnikar KW; Seley-Radtke KL; Sterchenko VA; Sokolov YA; Miroshnikov AI; Mikhailopulo IA. Recognition of Artificial Nucleobases by E-coli Purine Nucleoside Phosphorylase versus its Ser90Ala Mutant in the Synthesis of Base-Modified. <i>Nucleosides Chemistry - A European Journal</i> , Volume 21, Issue 38, Pages 13401–13419, (2015), DOI: 10.1002/chem.201501334 2. Esipov, Roman S.; Makarov, Dmitry A.; Stepanenko, Vasily N.; Miroshnikov, AI . Development of the intein-mediated method for production of recombinant thymosin 134 from the

					acetylated in vivo fusion protein <i>Journal of Biotechnology</i> V: 228 P: 73-81, (2016) DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.021 3. Esipov RS; Abramchik YA; Fateev IV; Murayova TI; Artemova KG; Konstantinova ID; Kuranova IP; Miroshnikov AI. Recombinant phosphoribosyl pyrophosphate synthetases from <i>Thermus thermophilus</i> HB27: Isolation and properties. <i>Russian Journal of Bioorganic Chemistry</i>, Volume 42, Issue 5, Pages 512–521, (2016) DOI:10.1134/S1068162016040075
--	--	--	--	--	--

Заведующий лабораторией биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)
Адрес: 117997. Москва, Миклухо-Маклая, 16/10
Тел: +7-(495) 995-55-57 (доб. 20-05)
Адрес электронной почты (е-май): aiu@ibch.ru
доктор химических наук, академик РАН

Подпись академика РАН А.И. Мирошников А.И.
Ученый секретарь ИБХ РАН
доктор физико-математических наук


Мирошников А.И.

Олейников В.А.

