

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
Чл

РАН
С.В.

ведущей организации на диссертационную работу М.М. Гусятинера М.М. «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 диссертации

Работа посвящена теоретическим и методическим вопросам создания бактериальных мутантов, которые предназначены для промышленного производства аминокислот методом ферментации. Рост производства аминокислот непрерывно происходит во многих развитых странах мира, а сами аминокислоты используются практически повсеместно главным образом в качестве добавки в корм сельскохозяйственных животных. Естественные корма животных бедны по составу некоторыми аминокислотами, что замедляет их рост, непроизводительно увеличивает затраты на корма. Добавка дефицитных аминокислот, таких как лизин, треонин, триптофан, метионин нормализует синтез белка и резко увеличивает эффективность кормов, снижая себестоимость производства мяса и птицы. Ряд других аминокислот находит широкое применение в медицине: смеси для парентерального питания, в качестве исходных веществ для синтеза ряда медицинских препаратов и питания для спортсменов. В частности, серосодержащая аминокислота цистеин, созданию продуцентов которой посвящена значительная часть данного исследования, широко используется в хлебопекарном производстве, улучшая вкусовые и органолептические свойства хлеба.

Получение аминокислот с помощью бактерий исторически началось с использования выделенных из природы микробов, которые обладали способностью к накоплению аминокислот в среде их культивирования.

Однако это касалось продукции только немногих аминокислот (глутамата, пролина). Современные штаммы-продуценты получают различными селекционными, генетическими и генно-инженерными методами, в корне перестраивающими метаболизм и приводящими к созданию биохимических машин, работающих почти исключительно для синтеза конкретной аминокислоты, перерабатывая углеводы с близким к теоретическому выходом конечного продукта. Конструирование высоко эффективных штаммом-продуцентов аминокислот и их использование в промышленности в конечном итоге приводит к снижению себестоимости важнейших продуктов питания (мяса, молока), вкусовых добавок в пищу, а также некоторых медицинских препаратов. Данная диссертация посвящена созданию такого рода микробных продуцентов, что отвечает потребностям народного хозяйства, и в связи с этим тема данного исследования несомненно актуальна.

Связь с планами научных исследований микробиологической промышленности Российской Федерации.

Исследования проводились в Научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ВНИИГенетика) в соответствии с заданиями Главмикробиопрома при Совете Министров СССР, направленными на создания в стране промышленного производства аминокислот как сельскохозяйственного, так и чистых аминокислот медицинского назначения. Данные исследования представлены в разделах диссертации 3.1 – 3.5. Исследования, связанные с созданием продуцентов цистеина, проводились в соответствии с научными планами ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (Раздел 3.6).

Новизна исследований и полученных результатов.

Исследования, приведенные в диссертации, обладают новизной и оригинальностью. Новизна результатов подтверждается большим количеством выданных Гусятинеру М.М. с соавт. патентов на изобретение штаммов, продуцирующих аминокислоты, как в нашей стране, так и за рубежом. В частности, Гусятинер М.М. (Gusyatiner) является автором 47 патентов США, выданных в период с 1981 по 2015 г., которые соответствуют критерию новизны.

Значимость для науки и производства полученных автором результатов.

Исследования, проведенные автором диссертации, направлены на создания бактериальных штаммов-продуцентов, предназначенных для промышленного производства аминокислот как в нашей стране, так и за рубежом (Япония, Франция, США, Бразилия и др.). Научную значимость представляют результаты, касающиеся механизмов и биохимических путей сверхпродукции ряда аминокислот (фенилаланин, треонин) и их генетического контроля в бактериях *C. glutamicum* и *E. coli*, а также генетического контроля транспорта клетками *E. coli* метаболитических предшественников цистеина. Научный интерес представляет также высказанная автором гипотеза, основанная как на его собственных экспериментальных данных, так и на данных научной литературы, о природе синтеза 2-гидроксиглутаровой кислоты в пути биосинтеза серина клетками *E. coli*.

Результаты и выводы диссертации могут быть использованы при создании продуцентов как низкомолекулярных веществ (аминокислоты, производные аминокислот, нуклеиновые основания, витамины), так и продуцентов некоторых белков. Это касается научно-исследовательских институтов ГОСНИИгенетика, Института Микробиологии РАН, Института биохимии и физиологии микроорганизмов (г. Пущино), а также лабораторий российских заводов, производящих лизин.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Научные положения, выводы и заключения диссертации основаны на анализе большого экспериментального материала, полученного автором, и на основе анализа современной научной литературе по данной теме. Выводы работы корректны и адекватны представленным в диссертации исследованиям и не вызывают сомнений. Можно отметить недостаточную статистическую обработку полученных данных, что касается определения величин ферментативных активностей в клетках мутантов с нарушенной деградацией треонина. Это, однако, не вызывает сомнений в правильности основных выводов работы, поскольку они подтверждены позднее в практике применения в производстве полученных штаммов с нарушенной деградацией этой аминокислоты.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность, замечания по оформлению.

Диссертация написана по традиционному плану, состоит из введения, обзор литературы, материалов и методов, результатов и обсуждение,

заклучения и списка литературы, включающего 332 наименования. Она содержит 262 стр. текста, 60 рисунков и 25 таблиц.

Во введении обосновывается актуальность темы, цели и задачи исследования, научная новизна и практическая и теоретическая значимость исследований, а также положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы (Глава 1) посвящен генетике и молекулярной биологии микроорганизма *Corynebacterium glutamicum* – исторически первому промышленному продуценту аминокислот. Этот микроорганизм можно считать наиболее изученным с точки зрения его главной особенности – способности к продукции глютаминовой кислоты. На основе этого микроорганизма позднее были созданы и по-прежнему создаются продуценты большинства других протеиногенных аминокислот. Однако механизм продукции глютаминовой кислоты, которую продуцирует дикий тип этой бактерии, выделенный из природы, несмотря на всесторонние исследования в течение уже 50 лет остается не до конца познанным. В обзоре приводится анализ этого обширного материала и делаются собственные предположения о глубинных причинах продукции глутамата в определенных условиях среды. Обзор может быть полезен исследователям, использующим этот объект в качестве продуцентов как низкомолекулярных веществ, так и белков.

В третьей главе (Результаты и обсуждение) в разделах 3.1-3.4 представлены оригинальные методы генетических и биохимических исследований объекта *C. glutamicum*, которые использованы автором в последующей работе: метод пенициллинового обогащения негативными мутантами, который ранее не удавалось применить по отношению к данному микроорганизму. Предложен и использован метод пермеабилзации клеток *C. glutamicum* для определения и изучения активностей и аллостерических свойств ферментов, исключающий разрушение клеток, при котором часто происходит снижение активности и искажение регуляторных свойств ферментов. Анализ механизмов продукции ароматических аминокислот клетками *C. glutamicum* позволил опровергнуть прежнее мнение о накоплении фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами. Как убедительно показано автором, на самом деле происходит накопление предшественника тирозина – арогената, который во внешней среде при подкислении среды без участия ферментов превращается в фенилаланин. Подобное превращение происходит и с префеновой кислотой (общий предшественник фенилаланина и тирозина), который неферментативно превращается в предшественник фенилаланина – фенилпируват. Такие превращения характерны для *C.*

glutamicum, у которого действует особый, аrogenатный, путь образования тирозина.

Как известно, в институте ВНИИГенетика впервые в мире была применена методология генной инженерии для создания продуцентов аминокислот, первым из которых был треониновый продуцент на основе *E. coli*. В этом самое активное участие принимал автор данной диссертационной работы. В разделе 3.5 представлены данные, связанные с дальнейшим усовершенствованием генно-инженерных продуцентов треонина. В результате этого исследования удалось предотвратить деградацию треонина, значительно улучшив параметры штаммов-продуцентов. Исследованы три пути возможной деградации треонина клетками *E. coli* и их роль в этом процессе. Это исследование имеет не только чисто практическую направленность, но и важно с научной точки зрения.

Раздел 3.6 описывает исследования пути биосинтеза цистеина и серина, решению задач, возникших в ходе создания продуцентов цистеина. Научный и практический интерес представляет устранение ингибирования цистеином фермента контролирующего уровень синтеза этой аминокислоты – О-серинацетилтрансферазы. Эта задача была решена на основе компьютерного анализа трехмерной структуры активного центра фермента с последующей модификацией его (сайт-специфический мутагенез) с сохранением каталитической активности. При этом ингибирование активности цистеином было полностью устранено. Такая модификация фермента нашла применение в штаммах, продуцирующих цистеин в промышленных условиях. Интересно также обнаруженное явление продукции альфа-гидроксиглутаровой кислоты в ходе продукции цистеина и объяснение механизма ее продукции. Недавно обнаружено, что многие типы злокачественных опухолей также продуцируют это же вещество. Обнаруженное автором явление проливает дополнительный свет на возможные источники синтеза альфа-гидроксиглутаровой кислоты раковыми клетками, а также открывает возможность использования этого вещества для диагностики рака.

Заключение

Автореферат диссертации Гусятинера М.М. соответствует основному содержанию диссертации. Опубликованные научные статьи и патенты (29 публикаций) подтверждают и расширяют содержание диссертации. Практическая и теоретическая значимость данной работы подтверждается также присуждением автору диссертации (с соавторами) Премии Правительства РФ за 2011 г. «за разработку и внедрение инновационных биотехнологических процессов производства природных аминокислот для

агропромышленного комплекса» (распоряжение Правительства РФ от 6 февраля 2012 г. № 146-р).

Таким образом, диссертация Гусятинера Михаила Марковича является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, а также решен ряд проблем, имеющих важное значение для народного хозяйства, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие страны, что соответствует требованиям 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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени.

Отзыв обсужден на заседании Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики ИМГ РАН 10 января 2018 г., протокол № 11.

Заведующий Отделом вирусной и клеточной
молекулярной генетики,
доктор биол. наук, проф.

В.З. Тарантул

Подпись В.З. Тарантула заве
Ученый секретарь ИМГ РАН
канд. биол. наук

Л.Е. Андреева

СВЕДЕНИЯ

о ведущей организации

по 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»
на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Полное наименование организации в соответствии с Уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук
Сокращенное наименование организации в соответствии с Уставом	ИМГ РАН
Полное наименование кафедры	Отдел вирусной и клеточной молекулярной генетики
Почтовый индекс, адрес организации	123182 Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2
Веб-сайт	img.ras.ru
Телефон	+7-499-196-00-00
Адрес электронной почты	img@img.ras.ru

Список основных публикаций работников ведущей организации

1. Maximov V.V., Martynenko A.V., Arman I.P., Tarantul V.Z. Humanin Binds MPP8: mapping interaction sites of the peptide and the protein. J. Peptide Science, 2013, 19, №5, 301-307.
2. Nenasheva V.V., Kovaleva G.V., Khaidarova N.V., Novosadova E.V., Manuilova E.S., Antonov A.A., Tarantul V.Z. Trim14 overexpression causes the same transcriptional changes in mouse embryonic stem cells and human HEK293 cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 2014, 50, №2, 121-128.
3. Nenasheva V.V., Kovaleva G.V., Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Vorkunova G.K., Chernyshenko S.V., Khaidarova N.V., Tarantul V.Z. Enhanced expression of trim14 gene suppressed Sindbis virus

- reproduction and modulated the transcription of a large number of genes of innate immunity. *Immunologic Res.*, 2015, 62, 255-262. DOI 10.1007/s12026-015-8653-1.
4. Miropolskaya N., Esyunina D., Kulbachinskiy A. 2017. Conserved functions of the trigger loop and Gre factors in RNA cleavage by bacterial RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* 292: 6744-6752.
 5. Agapov A, Olina A, Esyunina D, Kulbachinskiy A. 2017. Gfh factors and NusA cooperate to stimulate transcriptional pausing and termination. *FEBS Lett.* 591: 946-953.
 6. Petushkov I., Esyunina D., Kulbachinskiy A. 2017. s38-dependent promoter-proximal pausing by bacterial RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 45: 3006-3016.
 7. Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., Khmel I. Quorum-Sensing quenching by volatile organic compounds emitted by rhizosphere bacteria. In: *Molecular Microbiol. Ecology of the Rhizosphere*, v. 2, Ed. By Frans J. de Bruijn, 2013, John Wiley & Sons, Inc. P. 791-800.
 8. Plyuta V.A., Lipasova V.A., Kuznetsov A.E., Khmel I.A. Effect of salicylic, indole-3-acetic, gibberellic, and abscisic acids on biofilm formation by *Agrobacterium tumefaciens* C58 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2013, V. 49 N 8, P. 706-710
 9. Zaitseva Yu.V., Popova A.A., Khmel I.A. Quorum Sensing regulation in bacteria of the family Enterobacteriaceae. *Russian J. of Genetics*, 2014, v. 50, 323-340.
 10. A. A. Popova, O. A. Koksharova, V. A. Lipasova, Ju. V. Zaitseva, O. A. Katkova-Zhukotskaya, S. Iu. Eremina, A. S. Mironov, L. S. Chernin, I. A. Khmel. Inhibitory and toxic Effects of Volatiles emitted by Strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on Growth and Survival of selected Microorganisms, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 125704

Ученый секретарь ИМГ РАН
Кандидат биологических наук



Л.Е. Андреева