

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 217.013.01,

созданного на базе Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика) по диссертации на соискание ученой степени доктора наук.

Решение диссертационного совета от 22 мая 2018 г. № 15 о присуждении Гусятинеру Михаилу Марковичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Создание продуцентов аминокислот на основе бактерий *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*; исследование механизмов продукции» по специальности 03.02.07 – «Генетика» принята к защите 19 декабря 2017 г., протокол № 12а диссертационным советом Д 217.013.01, созданным на базе НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика (117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1), утвержденного приказом Минобрнауки РФ № 105/НК от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Гусятинер Михаил Маркович, 1947 г.р., диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Селекционно-генетическое исследование мутантов *Brevibacterium flavum* и *Escherichia coli*, резистентных к аналогу треонина α -амино- β -оксивалериановой кислоте» защитил в 1979 г в диссертационном совете, созданном на базе института ВНИИГенетика. 1970 по 1998 г. работал научным сотрудником и позднее заведующим лабораторией генетики и селекции продуцентов аминокислот в институте ГосНИИГенетика. С 1998 г. по 2013 работал заведующим лабораторией, а с 2013 г. по настоящее время научным советником в НИИ «Аджиномото-Генетика».

Работа выполнена в лаборатории генетики и селекции продуцентов аминокислот ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов «ГосНИИГенетика» и в лаборатории №1 ЗАО НИИ «Аджиномото-Генетика» .

Официальные оппоненты :

д.х.н., проф., академик РАН Мирошников Анатолий Иванович, заместитель директора Института Биоорганической химии РАН.

д.б.н., проф., член-корр. РАН Боронин Александр Михайлович, директор Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН

д.б.н., проф. Абилов Серикбай Каримович, заместитель директора Института общей генетики РАН дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация, «Институт молекулярной генетики РАН» (г. Москва), в своем положительном отзыве, подписанном заведующим отделом вирусной и клеточной молекулярной генетики д.б.н. профессором В.З. Тарантулом указала, что тема диссертации, посвященной созданию микробных продуцентов аминокислот, отвечает потребностям народного хозяйства, несомненно **актуальна**.

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: Гусятинер М.М. является автором 47 патентов США: В качестве критического замечания можно отметить недостаточную статистическую обработку при определении величин ферментативных активностей в клетках мутантов с нарушенной деградацией треонина. Это, однако, не вызывает сомнений в правильности выводов работы, поскольку они подтверждены позднее в практике применения в производстве полученных штаммов с нарушенной деградацией этой аминокислоты.

Совокупность разработанных автором диссертации теоретических положений можно квалифицировать как научное достижение, а внедрение предложенных решений ряда проблем, вносит значительный вклад в развитие народного хозяйства страны.

Всего автором опубликовано 66 печатных работ, включая патенты на изобретения. По теме диссертации автором опубликовано 29 печатных работ в рецензируемых изданиях.

1. Plokhov A.Y., Gusyatiner M.M., Yampolskaya T.A. et al. Preparation of γ -aminobutyric acid using E. coli cells with high activity of glutamate decarboxylase // Appl. Biochem. Biotechnol. 2000. V.88. pp. 257–265

2. Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Жданова Н.И., Нестеренко П.Н., Дегтярь В.Г. Бачина Т.А. Механизм продукции фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *C.glutamicum* //Биотехнология. 1989. т.5. №2. с.137-141.
3. Ростова Ю.Г. Ворошилова Э.Б., Якубович Н.В, Гусятинер М.М.,. Клонирование гена *pheA*, кодирующего нечувствительную к ингибированию фенилаланином префенатдегидратазу *C.glutamicum* //Биотехнология. 1990. №1. с.9-11
4. Шакалис И.О., Гусятинер М.М., Жданова Н.И. Генетическое картирование индуцированной транспозоном Tn5 мутации, блокирующей треониндегидрогеназу у *Escherichia coli* K-12 // Генетика. 1986. Т. XXIII. №12. С.2120-2127.
5. Гусятинер М.М. и др. Штамм бактерии *E.coli* ВКПМ В-3420 – продуцент L-треонина // Авт. св. СССР №1362021. 1986.
- 6 Kai Y, Kashiwagi T, Ishikawa K, Ziyatdinov MK, Gusyatiner M.M.,Redkina EI, Kiriukhin MY, Kobayashi S, Takagi H, Suzuki E. Engineering of *Escherichia coli* L-serine O-acetyltransferase on the basis of crystal structure: desensitization to feedback inhibition by L-cysteine. *Protein Eng Des Sel*. 2006. 19(4):163-7
- 7 M. M. Gusyatiner, M. Kh. Ziyatdinov. 2-Hydroxyglutarate production is necessary for the reaction catalyzed by 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Review Journal of Chemistry*. 2015, Volume 5, Issue 1, pp 21–29

На диссертацию и автореферат поступили **положительные** отзывы:

Из Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии от заведующего лабораторией выживаемости микроорганизмов д.б.н., профессора Д.А. Складнева;

С Факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова от д.б.н. от профессора Миронова А.А.;

Из БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт»-ГосНИИгенетика от к.б.н. Т.В.Юзбашева;

из ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи от ведущего научного сотрудника " д.б.н. Романовой Ю.М.

и от руководителя лаборатории генетики бактерий д.б.н. Каратаева Г.И.

из ЗАО НИИ «Аджиноомото-Генетика» от с.н.с. д.б.н профессора Ахвердяна В.З.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными интересами и достижениями в области генетики, микробиологии и молекулярной биологии микроорганизмов, позволяющими оценить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Разработаны методики пермеабилзации клеток коринебактерий и кишечной палочки, позволяющие проводить биохимические реакции в том числе в промышленных масштабах для изучения аллостерических свойств ферментов и для получения ряда веществ биотрансформацией (на примере гамма-аминомасляной кислоты). **Разработан** метод пенициллинового обогащения культуры *C. glutamicum*, значительно упрощающий отбор негативных биохимических мутатов.

Показано, что Тирозиновые ауксотрофы *C. glutamicum* продуцируют не фенилаланин, как предполагалось ранее, а арогенат, который при подкислении среды неферментативно превращается в фенилаланин.

Обнаружена деградация фенилаланина клетками *C. glutamicum*. Ауксотрофность по тирозину в результате блокирования гена *tyrA* предотвращает деградацию фенилаланина клетками *C. glutamicum*.

Показано, что

- серинтрансгидроксиметилаза (ген *glyA*) *E. coli*, участвует в деградации треонина;
- восстановление S-сульфоцистеина до цистеина клетками *E. coli* катализирует глутаредоксин C (ген *grxC*);
- повышенная экспрессия гена *grxC* увеличивает продукцию цистеина продуцентами цистеина при использовании тиосульфата в качестве источника серы;
- S-сульфоцистеин поглощается клетками *E. coli* с помощью трансмембранного белка YdjN;

- известный экспортер дипептидов YdgR участвует импорте предшественника цистеина О-ацетилсерина.

Теоретическая значимость исследований обосновано тем, что **установлены и объяснены** следующие явления. **1)** Продукция фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *C. glutamicum* происходит арогенатным путем, без участия ферментов; **2)** **Установлено** положение на генетической карте *E.coli* гена *tdh*, кодирующего треониндегидрогеназу. **3)** **Показано**, что треонинальдолазная активность в *E.coli* обусловлена вторичной активностью серинтрансгидроксиметилазы (ген *glyA*) и участвует в деградации треонина. **4)** **Предложен** механизм первой реакции в пути биосинтеза серина в *E.coli*, катализируемой 3-фосфоглицератдегидрогеназой (ген *serA*), объясняющий неизбежность продукции этим ферментом 2-гидроксиглутарата. Предполагается, что субстрат реакции, 3-фосфоглицерат, окисляется за счет восстановления 2-кетоглутарата до 2-гидроксиглутарата. **5)** **Установлено**, что трансмембранный белок YdjN импортирует S-сульфоцистеин из среды в клетки, где он превращается в цистеин. Это превращение катализируется глутаредоксином С.

Значение полученных результатов исследований для практики подтверждается тем, что **разработаны и внедрены** в производство бактериальные штаммы-продуценты треонина со сниженной способностью к деградации этой аминокислоты, а также продуценты цистеина на основе кишечной палочки и *Pantoea ananatis*, способные усваивать как тиосульфаты и сульфаты в качестве источников серы.

Практическая значимость исследований подтверждается получением российских и международных патентов на изобретения, которые переданы по лицензионным соглашениям ряду зарубежных биотехнологических компаний и используются ими в промышленности, а также присуждением Гусятинеру М.М. в числе соавторов **премии Правительства Российской Федерации за 2011 год** «за разработку и внедрение инновационных биотехнологических процессов производства природных аминокислот для агропромышленного комплекса»

(Распоряжение Правительства Российской Федерации от 6 февраля 2012 г. N 146-р г.).

Оценка достоверности результатов исследования выявила: что научные положения и выводы основаны на экспериментальных результатах, полученных с использованием комплекса современных методов генетики и селекции микроорганизмов, включающих методы генной инженерии и биоинформатики. **Использованы** современные методы физико-химического анализа продуктов метаболизма: тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC), автоматические хроматографы, методы радиоавтографии. **Применялись** современные методы ферментации в лабораторных ферментерах, оборудованных автоматической системой поддержания заданных параметров.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении экспериментальной работы, планировании исследований, а также в руководстве экспериментальными работами, анализе и обсуждении полученных результатов. Автор также являлся основным участником написания статей и патентов на изобретения по результатам работы.

На заседании 22 мая 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Гусятинеру М.М.. ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 6 докторов наук по специальности 03.02.07 –генетика, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 18, против - нет, недействительных – нет.

Председатель диссертационного совета

д.б.н., профессор, академик РАН

Дебабов В.Г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент

Воюшина Т.Л.