

УТВЕРЖДАЮ  
Врио директора ФГБНУ  
«Всероссийский научно-исследовательский  
и технологический институт биологической  
промышленности»  
чл.-корр. РАН, д.б.н., профессор  
Алексей Дмитриевич Забережный

« 14 » апреля 2021 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации **Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» (ФГБНУ ВНИТИБП)** на диссертационную работу **Дорошенко Веры Георгиевны «Направленные модификации хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента фенилаланина**», представленную в диссертационный совет Д 002.247.02 при **Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

**Актуальность темы диссертации.** В законодательстве многих стран появляются ограничения по использованию «плазмидных» штаммов в производстве продуктов для пищевой промышленности и медицины. Представленная научная работа Дорошенко В.Г. выполнена в Акционерном обществе «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», являющемся структурным подразделением биотехнологической компании Ajinomoto (Япония) и посвящена проблеме совершенствования штамма-продуцента незаменимой ароматической протеиногенной аминокислоты фенилаланина методами метаболической инженерии, используя «безплазмидные» продуценты *E.coli*. Актуальность исследования связана с необходимостью развития микробиологического производства

для получения биологически активных соединений, в том числе аминокислот. Получение клетками микроорганизмов полезных соединений из возобновляемого сырья, в качестве которого обычно используется глюкоза или сахароза, является, как минимум, экологически более безопасным процессом по сравнению с химическим синтезом. Кроме того, преимуществом микробиологического перед химическим синтезом является возможность создания биологически активного L-стереоизомера целевого метаболита, в то время как при промышленном химическом катализе образуется рацемическая смесь L- и D-изомеров. Получаемый микробиологической промышленностью L-фенилаланин используется как пищевая и кормовая добавка, в фармацевтике, а также как субстанция для производства низкокалорийного заменителя сахара – аспартама (L-аспартил-L-фенилаланин).

#### **Научная новизна полученных результатов и выводов.**

Автором на основе определения структур двух вариантов сахарозного транспозона Tn2555 предложена модель перемещения этого элемента. Согласно этой модели Tn2555 являлся псевдотранспозоном, т.е. он не перемещался как единое целое. Модель была подтверждена с помощью молекулярно-генетических экспериментов. Предложен способ получения штаммов *E. coli*, усваивающих сахарозу, с помощью искусственной системы Ми-интеграции, разработанной в АО «АГРИ». С помощью модельных продуцентов ароматических аминокислот, созданных в работе методом рекомбинационной инженерии, охарактеризован экспортёр ароматических аминокислот YddG. Разработан инновационный подход ослабления конкурирующего пути биосинтеза, которым, в случае продукции фенилаланина, является синтез тирозина. Для этой цели был эффективно применён природный механизм C-концевого программируемого протеолиза, используемого клеткой для удаления неполноценных пептидов трансляции 5'-фрагментов мРНК. С помощью такого подхода впервые был получен продуцент фенилаланина, который не накапливал

тирозин в виде нежелательной примеси к целевому продукту. Впервые показано, что для получения продукции фенилаланина в *E. coli*, наряду с собственной хоризмат-синтазой, можно использовать бифункциональную хоризмат-синтазу из *Saccharomyces cerevisiae*. Впервые, на примерах использования промоторов фосфорного регулона, индуцируемых при дефиците неорганического фосфора в среде, показана возможность применения метаболической регуляции для организации потенциально двухстадийного процесса (накопление биомассы и целевой биосинтез) производства фенилаланина. Промоторы Pho-регулона контролировали экспрессию гена нечувствительной к ретроингибированию фенилаланином 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазы, фермента, контролирующего поток углерода из центрального метаболизма на синтез ароматических соединений.

**Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Анализ актуальных литературных данных позволил автору представленной работы четко сформулировать цель и задачи исследований. Очевидно, что для их выполнения был необходим широкий ряд современных методов и приемов исследований. О высокой квалификации автора также свидетельствует четкое планирование, задачи каждого последующего этапа вытекают из результатов, которые были получены на предыдущем этапе исследования. Стоит отметить также тщательную интерпретацию результатов проведенных экспериментов. Полученные в ходе проведенных исследований результаты подтверждались методом статистического анализа с определением степени достоверности. Положения, выносимые на защиту, являются научно обоснованными. Выводы и практические рекомендации соответствуют полученным в ходе исследований результатам. Обоснованность подходов и выводов диссертации обеспечивается за счет многочисленных экспертных оценок различных этапов работы при публикациях в ведущих научных изданиях. Основные положения и результаты дис-

сертационной работы доложены и положительно оценены на престижных всероссийских и международных конференциях.

**Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов** подтверждается современными методами исследования и анализа. Все декларированные интеграции в хромосому проверялись посредством анализа фрагментов ДНК, полученных с помощью ПЦР, в том числе, если это было необходимо, и сиквенированием ДНК. Экспрессия генов и белков анализировалась, в зависимости от задачи: ПЦР, сопряжённой с обратной транскрипцией; визуализацией в полиакриламидном геле и последующим анализом (по потребности) зон белков при помощи масс-спектрометрии; определением активности фермента. Эффекты от проведённых генетических модификаций в штаммах оценивались по продукции аминокислоты (определяемой с помощью тонкослойной хроматографии) в ферментации в пробирках или в аппаратах. Опыты проводили в двух- трёх повторностях, что зафиксировано в приводимых стандартных отклонениях.

**Теоретическая значимость результатов**, полученных автором диссертации, состоит в расширении спектра основных методов и стратегий конструирования продуцентов ароматических аминокислот за счёт идентификации и практического использования первого потенциального экспортёра этих аминокислот, а также пионерское введение в практику метаболически инженерного конструирования продуцентов аминокислот природных контролируемых элементов (промоторы Pho-регулона, С-концевой программируемый протеолиз).

**Практическая значимость работы** подтверждена практическим внедрением в промышленное производство на заводы известной биотехнологической японской компании «Adjinomoto» штаммов-продуцентов фенилаланина с полученными в работе оригинальными модификациями, что подтверждается соответствующими международными патентами.

**Оценка содержания и завершенности диссертации.**

Структура диссертационной работы Дорошенко В.Г. представлена в традиционной форме, изложена на 210 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, список литературы. Работа иллюстрирована 28 таблицами, 46 рисунками. Список литературы содержит 308 наименований.

**Во введении** автором обоснована актуальность работы, определены цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость, сформулированы научные положения, выносимые на защиту. Во введении автор подчеркнул, что все представленные в диссертации исследования выполнены с использованием или конструированием некоммерческих штаммов-продуцентов *E. coli*, генотип и свойства которых разрешены к опубликованию в открытой научной печати.

**Обзор литературы** состоит из пяти глав. **В первой**, самой короткой, даётся понятие системно-ориентированного или как принято говорить в западной литературе — «рационального» конструирования штаммов, включающего не только инженерию биосинтетического пути, но и учитывающего запросы параллельно разрабатываемых процессов ферментации и очистки продукта. Следующие главы посвящены современному состоянию научных знаний в тех областях, которые использовались при получении определенных генетических модификаций.

**Во второй главе** рассмотрен используемый в природе путь биосинтеза фенилаланина, а также уже известные методы направленного конструирования продуцентов фенилаланина на основе *E. coli*. Создание коммерческого продуцента этой аминокислоты с помощью методов традиционной селекции было невозможно в силу существующей сложной многоуровневой природной регуляции биосинтеза этой аминокислоты у бактерий.

**В третьей главе** приводятся сведения об утилизации сахарозы как одного из природных источников углерода в энтеробактериях, включаю-

щие характеристику ферментов, генов, их локализацию, а также имеющийся опыт их использования для получения лабораторных штаммов, растущих на сахарозе. История вопроса заключалась в том, что признак утилизации сахарозы был факультативным у энтеробактерий и лабораторные штаммы, используемые для получения продуцентов аминокислот, не росли на сахарозе. Признак утилизации сахарозы штамма-продуцента позволяет расширить сырьевую базу производства, а также использовать отходы сахарного производства в виде мелассы.

**Четвёртая глава** обзора литературы посвящена идентификации и характеристике экспортёров аминокислот у промышленно значимых бактерий *E. coli* и *Corynebacterium glutamicum*. Делается акцент на то обстоятельство, что обеспечение активного экспорта целевой аминокислоты из клетки продуцента является необходимым условием создания промышленного продуцента.

**Пятая глава** посвящена характеристике регуляторных систем *E. coli*, элементы которых использовались, в качестве конструкционных, в работе. Это молекулярные механизмы клеточного ответа и программируемый протеолиз.

**Раздел «Материалы и методы»** включает одиннадцать подразделов, в которых исчерпывающе описаны использованные в работе современные методы конструирования штаммов, условия их культивирования в различных средах, включая проведение ферментаций, манипуляции с ДНК, РНК, белками, методики определения активности ферментов, а также общее представление об анализе метаболических потоков. При описании некоторых методов, включая последний, есть упоминание о сотрудниках АО «АГРИ» и других научно-исследовательских организаций, совместно с которыми проводилось исследование. Эти сотрудники, как правило, являются соавторами в публикациях отдельных результатов, полученных в ходе выполнения данной диссертационной работы.

**Раздел «Результаты и обсуждение»** содержит шесть подразделов по числу задач, решаемых в работе. **В первом подразделе** представлены результаты изучения сахарозного транспозона Tn2555, которые привели автора к выводу о нецелесообразности использования этого элемента для получения промышленных продуцентов, первичная структура генома которых должна быть известна. Перемещение Tn2555 из донорного в реципиентный репликон могло сопровождаться изменениями структуры транспозона. После этого вывода авт. был разработан новый подход получения сахарозоположительных штаммов *E. coli*. Гены утилизации сахарозы были интегрированы в хромосому с помощью специально полученного интегративного вектора на основе фага Mu. Полученные таким образом интегранты можно было картировать с использованием комбинации молекулярно-биологических методик рестрикции и лигирования ДНК и ПЦР. Показано, что использованные подходы могут с успехом применяться для создания продуцентов фенилаланина и триптофана, растущих на сахарозе в качестве единственного источника углерода.

**Во втором подразделе** на примерах создания модельных продуцентов ароматических аминокислот и гистидина проиллюстрировано применение рекомбинационной инженерии (Recombineering) с использованием Red системы бактериофага  $\lambda$  для проведения направленных модификаций (редактирования) бактериальной хромосомы и, как итог, получение безплазмидных штаммов с заранее запланированными структурами геномов.

**В третьем подразделе** представлены исследования белка внутренней цитоплазматической мембраны *E. coli*, кодируемого геном *yddG*, позволяющие сделать вывод о том, что указанный белок может работать в качестве экспортёра ароматических аминокислот из клетки.

**В четвертом подразделе** впервые описано получение продуцента фенилаланина, не нуждающегося в тирозине и не продуцирующего его в качестве примеси. Для этой цели структура префенатдегидрогеназы (продукта гена *tyrA*) была изменена таким образом, что соответствующий му-

тантный фермент стал чувствительным к С-концевому программируемому протеолизу.

**В пятом подразделе** с использованием гетерологичной бифункциональной хоризмат-синтазы дрожжей проводится исследование одного из потенциальных узких мест биосинтеза фенилаланина на внутриклеточный дефицит кофактора флавиномононуклеотида в созданных штаммах продуцентах.

**В шестом подразделе** представлены исследования, которые привели к идее использования природной регуляции фосфатного голодания для контроля синтеза фенилаланина в клетке продуцента.

**В Заключении** автор определяет значение результатов своей работы в современных способах конструирования продуцентов аминокислот, приводит примеры дальнейшего использования экспортёра ароматических аминокислот, а также предлагает возможные варианты использования С-концевого программируемого протеолиза для конструирования штаммов в экспериментах по метаболической инженерии.

**Выводы**, завершающие работу, сформулированы по результатам решения каждой из шести задач исследования.

**Автореферат диссертации соответствует содержанию диссертационного исследования**, а основные полученные в работе результаты нашли свое отражение в публикациях автора в ведущих мировых и отечественных научных журналах из списка, рекомендованных ВАК РФ, а также в полученных автором международных патентах.

**Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.** Результаты диссертационного исследования могут быть рекомендованы к использованию в ведущих научных центрах Российской Федерации, а также центрах и институтах РАН, занимающихся молекулярной биологией, физиологией, генетикой и биотехнологией микроорганизмов с конечной целью конструирования штаммов-продуцентов различных практически значимых биологически активных веществ и соединений. К таким институтам и



центрам можно отнести НИЦ "Курчатовский институт" (ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов; ФГБУ Институт молекулярной генетики); ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ФГБУ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарта РАН, ФГБУ Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН; ФГБУ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Кроме того, выводы диссертации, а также новые методы и стратегии метаболической инженерии продуцентов аминокислот могут войти в структуру образовательных и специализированных курсов для студентов университетов и ВУЗов, специализирующихся в области биоинженерии, биотехнологии, а также системной и синтетической биологии и метаболической инженерии – таких как биологические и биотехнологические факультеты Московского, Санкт-Петербургского и Новосибирского Государственных Университетов, МФТИ, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Института тонких химических технологий им. М.В.Ломоносова.

### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы нет.

При анализе диссертационного исследования ведущей организации следует высказать пожелание автору: оформить Приложение документов, подтверждающих высочайшую научную и интеллектуальную составляющую, а также внедрение результатов работы в мировую практику. Раздел «Приложения» не является обязательным разделом диссертации. Вместе с тем, этот раздел позволяет представить различные вспомогательные материалы, дополняющие и иллюстрирующие основной текст диссертации, что значительно усиливает положительное впечатление о работе диссертанта.

### **Заключение**

Следует подчеркнуть о сложившейся в процессе ознакомления общей положительной оценке диссертационной работы Дорошенко В.Г.

Диссертационная работа Дорошенко В.Г. «Направленные модификации хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента фенилаланина» является законченной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований, развивающих принципы конструирования штаммов-продуцентов аминокислот на основе *E. coli*, решена проблема получения продуцента фенилаланина нового поколения: не зависящего от тирозина, с увеличенной продукцией за счёт активации экспортёра этой аминокислоты и применения метаболической регуляции, а также утилизирующего сахарозу в качестве источника углерода.

Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, обоснованные выводы, свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку и характеризуется существенной практической значимостью.

По своей актуальности, методическому решению поставленных задач, объёму экспериментальных исследований, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов, рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор - Дорошенко Вера Георгиевна заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа, автореферат и отзыв рассмотрены и одобрены на расширенном заседании отделов: молекулярной биологии и вирусологии, конструирования противобактерийных препаратов и биологически активных веществ ФГБНУ ВНИТИБП, протокол № 3 от «12» апреля 2021 г.

Заведующая отделом молекулярной биологии

и вирусологии ФГБНУ ВНИТИБП,  
доктор биологических наук,  
профессор

И.Н. Матвеева

Подпись доктора биологических наук, профессора Матвеевой И.Н. заверяю:

Учёный секретарь ФГБНУ ВНИТИБП,  
кандидат сельскохозяйственных наук



Е.В. Маркова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский  
и технологический институт биологической промышленности»  
ФГБНУ ВНИТИБП

141142, Московская область, Щелковский район, пос. Биокombината

Тел./факс: 8 (49656)7-32-63

E-mail: [vnitibp@mail.ru](mailto:vnitibp@mail.ru)