

Отзыв

на автореферат диссертации Дорошенко Веры Георгиевны «Направленные модификации хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента фенилаланина», представленной на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность исследования Диссертационная работа Дорошенко В.Г. посвящена разработке новых подходов конструирования бесплазмидного продуцента фенилаланина на основе *Escherichia coli*. Темы работы, несомненно, актуальна и связана с развитием микробиологической промышленности для получения не только аминокислот, но и других полезных соединений на основе возобновляемого природного сырья из глюкозы или сахарозы.

Научная новизна. Большинство из задач, исследованных и решенных в работе, имеет более общий характер, чем получение только продуцента фенилаланина на основе *E. coli*. Для факультативной по утилизации сахарозы *E. coli* автор разработал способ получения штаммов-продуцентов сахарозы с заданной структурой генома. С этой целью были использованы гены утилизации сахарозы, входящие в состав исследованного в работе транспозона. С целью повышения продукции фенилаланина впервые представлена полная характеристика потенциального экспортёра фенилаланина в *E. coli*. Продемонстрирована применимость этого транспортёра и для конструирования продуцентов других ароматических аминокислот. В работе предложен совершенно новый способ ослабления конкурирующего пути биосинтеза, за счёт чего решена проблема продукции фенилаланина без добавления тирозина в среду культивирования. Впервые в работе применена метаболическая регуляция синтеза фенилаланина с использованием промоторов, активирующихся при истощении неорганического фосфора в среде.

Большинство из разработанных автором подходов и генетических модификаций запатентовано для использования в производстве компании Аджиномото (Япония), в структурном подразделении которой АО «НИИ Аджиномото-Генетика», была выполнена работа.

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе и две обзорные статьи, в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ. Кроме того, получено 10 патентов на изобретения.

Теоретическая и практическая значимость.

На основные результаты данной работы компания Аджиномото (Япония) получила патенты, подтверждающие их приоритетность и практическую значимость.

Доказано, что кластер сахарозных генов *scr*, кодирующих ферменты утилизации сахарозы с транспортом, зависимым от фосфотрансферазной системы (PTS) бактерии, находится в составе псевдотранспозона Tn2555. Предложен способ получения продуцентов с заранее определённой, генетически детерминированной структурой, содержащих гены утилизации сахарозы в хромосоме. (Патент РФ № 2212447 и его аналоги: EP 1149911; US 6960455; US 7179623). Охарактеризован экспортер ароматических аминокислот YddG. Получены модификации хромосомы, приводящие к активации экспорта аминокислоты из клетки, которые были использованы в продуцентах ароматических аминокислот (Патент РФ № 2222596 и его аналоги: US 7666655; EP 1449918). Разработан новый подход ослабления конкурирующего пути биосинтеза, основанный на С-концевой протеолитической деградации продукта прецизионно сконструированного аллеля целевого гена. С использованием этого подхода был впервые получен продуцент L-фенилаланина *E. coli*, не нуждающийся в тирозине и не накапливающий его в процессе ферментации (Патент РФ № 2264459 и его аналоги: US 9376695; FR 2922218; JP 5217850; US 9708637). Впервые продемонстрировано использование гетерологичной хоризмат-синтазы для получения продукции L-фенилаланина в *E. coli*. Впервые показано использование промоторов Pho-регулона для повышения продукции аминокислот, в частности, фенилаланина (Патент РФ № 2405040 и его аналоги: EP 1990416; US 8394612). Большинство из разработанных подходов, исследованных или аналогичных генетических модификаций, было практически использовано автором и его коллегами при создании продуцентов фенилаланина на основе *E. coli*, внедрённых фирмой Аджиномото в действующее мировое биотехнологическое производство.

Обоснованность и достоверность. Все выводы работы экспериментально обоснованы. Проведённые в диссертации исследования впечатляют большим объёмом и характеризуются целостностью и завершёностью.

Автореферат оформлен в соответствии с действующими правилами, структурирован и полностью отражает основные положения диссертационного исследования. Автореферат написан хорошим литературным языком, содержит единичные технические опечатки, достаточно иллюстрирован таблицами и рисунками. Цель, задачи и основные

положения, выносимые на защиту, сформулированы четко. Выводы обоснованы, соответствуют задачам и отражают содержание автореферата.

Заключение. Диссертационная работа «Направленные модификации хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента фенилаланина» полностью соответствует требованиям п.п.9-11, 13-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.13 г. № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ от 21.04.16 г. № 335, от 02.08.16 г. № 748, от 29.05.17 г. № 650, от 28.08.17 г. № 1024, от 01.10.18 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора биологических наук, а ее автор, Дорошенко В.Г., заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Руководитель лаборатории генетики бактерий, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор биологических наук

Геннадий Иванович Каратаев

Адрес: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8(499)193-30-01, karataevgi@rambler.ru

Подпись д.б.н., руководителя лаборатории генетики бактерий, ведущего научного сотрудника Геннадия Ивановича Каратаева заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

кандидат биологических наук



Людмила Кондратьевна Кожевникова