

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)

В настоящее время микробиологический синтез продуктов обмена веществ у микроорганизмов, обусловленный специфическими ферментативными системами каждого из этих микроорганизмов, развивается с нарастающим ускорением. При этом, что вполне естественно, особое внимание уделяется именно тем соединениям, которые обладают физиологической активностью и имеют большой потенциал в использовании в народном хозяйстве. К такого рода веществам можно отнести довольно широкий спектр соединений: средства защиты растений, липиды, белки, ферменты, витамины, токсины, антибиотики, нуклеозиды, нуклеотиды, аминокислоты, спирты, биотопливо, полупродукты для последующего синтеза различных полимеров и др. Немаловажно отметить, что микроорганизмы находят самое широкое использование и в комплексной очистке грунтов, вод, атмосферы, т.е. биоремедиации. В качестве частного случая можно обозначить микробиологическую трансформацию различных органических соединений, которая использует активность специфических ферментативных систем, присущих конкретному микроорганизму, для модификации молекул органического соединения (например, стероидов), не меняя при этом его основной структуры. Достижения в данной области исследований привели, в конечном итоге, к формированию нового раздела науки – биотехнологии, а также новой отрасли – микробиологической промышленности.

В большой степени прогрессу в биотехнологии способствовало развитие целого ряда научных направлений, среди которых можно отметить:

- генетика микроорганизмов и методы их селекции;
- молекулярно-биологические методы исследования особенностей функционирования генома микроорганизмов, изучение механизмов клеточной регуляции;
- развитие методов полногеномного секвенирования ДНК;
- формирование методов точного и целенаправленного внесения изменений в состав геномной ДНК.

Объединенные научные достижения и результаты этих широкомасштабных исследований проявились в формировании нового направления в целевом конструировании на основе микроорганизмов штаммов-продуцентов конкретных соединений. Это направление в биотехнологических процессах получило название «метаболическая инженерия».

Диссертационная работа Дорошенко В.Г., направленная на конструирование на основе клеток *E.coli* высокоэффективного штамма-продуцента фенилаланина проведена именно в рамках метаболической инженерии. Следует отметить, что в самом начале исследования автор был ограничен появившимися в ряде стран законодательными ограничениями, касающимися использованию плазмидных штаммов-продуцентов при производстве продуктов для медицины и пищевой промышленности. Этот факт, хотя и не ограничивал Дорошенко В.Г. в использовании плазмид при промежуточных

исследованиях, но конечный продукт (штамм-продуцент) должен был быть свободным от векторной ДНК.

В связи с этим, решение каждой из задач, описанных в диссертационной работе, было воплощено в заранее определенных целевых модификациях хромосомы *E. coli*. Эта рекомбинационная модификация достигалась либо с использованием Red-системы фага λ, либо системы интеграции на основе бактериофагов Mu и φ80.

‘Одним из факторов, кроме эффективности биосинтеза целевого продукта, в биотехнологии является использование в процессе культивирования клеток штаммов-продуцентов дорогостоящего сырья, что ведет к существенному повышению себестоимости конечного продукта (в данном случае – фенилаланина). В аспекте решения этого вопроса Дорошенко В.Г. ввела в состав геномной ДНК клеток штамма *E. coli* гены утилизации сахарозы, что дало возможность использования в качестве источника углерода при культивировании штамма мелассы – побочного продукта сахарного производства. Хотелось бы отметить этот факт как определенное важное практическое достижение, т.к., если смотреть шире, то сконструирован своеобразный промежуточный «базовый штамм», обладающий по признаку утилизации сахарозы неоспоримым преимуществом перед исходным «диким» штаммом. Потенциально на его основе можно предпринять последующие попытки для конструирования штаммов-продуцентов других биологически активных соединений.

Не менее привлекательной является и часть диссертационной работы, направленная на однозначную характеризацию роли мембранных белка YddG в экспорте ароматических аминокислот. Процесс активной секреции ароматических аминокислот (в частности, фенилаланина) предотвращает критически высокое внутриклеточное накопление фенилаланина, растворимость которого достаточно невысока. Это может приводить к изменению функционирования клеток штамма-продуцента, вплоть до их гибели. Автору удалось решить эту проблему направленной реконструкцией геномной ДНК, в результате которой структурная часть гена *yddG* попадала под контроль сильного конститутивного промотора. Увеличение уровня биосинтеза соответствующего мембранных белка приводило к тому, что секреция целевой аминокислоты происходила более эффективно.

Также можно отметить, судя по автореферату, в работе Дорошенко В.Г. наличие полного и глубокого анализа всего круга проблем, которые возникают при введении в практическую работу уже сконструированного штамма-продуцента фенилаланина. Так, в силу того, что современные, используемые в промышленности штаммы-продуценты, в основном, являются тирозиновыми ауксотрофами, что вынуждало при культивировании вводить в состав среды эту аминокислоту. Это не только приводило к удорожанию конечного продукта, но и затрудняло эффективную очистку целевой ароматической аминокислоты. Автору удалось решить эту проблему ослабив биосинтез тирозина до необходимого уровня с использованием программируемого С-концевого протеолиза для префенатдегидрогеназы, т.е. разработкой вариантов гена *tyrA*, с введенными т.н. «ssrA-хвостами». В результате такой продуманной и целенаправленной реконструкции геномной ДНК клеток *E. coli* был сконструирован проторофный по тирозину (Tyr⁺) штамм-продуцент фенилаланина, не нуждающийся в добавке тирозина, но и, одновременно, не накапливающий эту аминокислоту в культуральной среде.

Дорошенко В.Г. не ограничилась достигнутыми в ходе экспериментальной работы важными результатами, но и на основании сравнительного анализа бифункциональной хоризмат-сингтазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способной к восстановлению флавинмононуклеотида, и монофункционального фермента из *E.coli* сделала обоснованный вывод о достаточности восстановленного флавинмононуклеотида в продуцентах фенилаланина на основе клеток *E.coli*. Этот результат является не только важным для дальнейших исследований, направленных на конструирование новых штаммов-продуцентов, но и открывает перспективу использования при этом гетерологичной хоризмат-сингтазы для биосинтеза ароматических аминокислот в клетках *E.coli*.

На мой взгляд, очень перспективным является и использование при конструировании штаммов-продуцентов (возможно, в будущем не только для ароматических аминокислот) промоторов Pho-регулона (*PphoA* и *PpstS*) для метаболически регулируемой транскрипции гена DAHP-сингтазы, *aroG4*, которая в условиях лимита в культуральной среде по неорганическому фосфату перенаправляет поток углерода из центрального метаболизма на синтез фенилаланина. Т.е. в данном случае используемые промоторы выполняют роль своеобразных «сенсоров», позволяющих провести частичное разделение при культивировании клеток штамма-продуцента фазы роста биомассы и фазы биосинтеза фенилаланина. Этот подход, безусловно, является важным для оптимизации самого процесса ферментации.

Следует отметить, что в рецензируемой работе с использованием методов рекомбинационной инженерии осуществлено также конструирование штаммов-продуцентов некоторых аминокислот (His, Trp, Tyr) с характеристиками, заранее предсказанными на основании дизайна их генетически-детерминированных структур. И, хотя эти штаммы-продуценты во многом являлись модельными и служили в качестве своеобразных «полигонов» для предварительного исследования при конструировании штамма-продуцента фенилаланина, они представляют собой отдельный интерес и обладают потенциалом для дальнейшего их развития в промышленные штаммы-продуценты.

В заключение отзыва анализа автореферата хотелось бы отметить, что данная диссертационная работа производит самое благоприятное впечатление. Очень привлекательным является последовательность проведенного исследования: теоретический анализ, основанный на глубоком анализе литературных данных – четкое планирование экспериментальной работы – проведение экспериментов и критическое рассмотрение полученных результатов. В ходе выполнения исследования Дорошенко В.Г. применяла широкий спектр адекватных поставленной задаче методов, многие из которых разработаны с участием и самого диссертанта. Этот факт позволяет быть полностью уверенным в достоверности и новизне полученных результатов, тем более что они широко отражены в публикациях в научных журналах, патентах (13 печатных работ в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ, 10 патентов) и неоднократно докладывались на отечественных и международных конференциях и симпозиумах. Т.е. материалы диссертационной работы доступны широкой научной общественности и прошли дополнительное международное рецензирование. Представленная работа

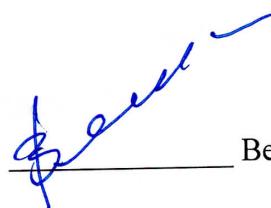
актуальна для микробиологического производства не только аминокислот, но и других полезных соединений, получаемых из возобновляемого природного сырья.

Результаты рассматриваемого диссертационного исследования могут найти свое использование в биотехнологических ВУЗах при формировании курсов по метаболической инженерии, а также в научных центрах РФ, институтах РАН, предметом исследований у которых является биоинженерия бактерий.

Представленная работа Доршенко В.Г., по своей сути, открывает новый подход не только к целенаправленному конструированию с использованием метаболической инженерии штаммов-продуцентов различных соединений, имеющих практический потенциал. Она имеет и более глубокий теоретический и практический смысл, т.к. создает логическую платформу (или алгоритм) для получения и исследования новых (например, частично гибридных) форм микроорганизмов, обеспечивая дополнительную информацию о фундаментальных принципах функционирования их геномов.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертация «Направленные модификации хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента фенилаланина» соответствует требованиям п.9-11, 13-14 Положения «О порядке присуждения ученым степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор, Дорошенко Вера Георгиевна, безусловно, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Вейко Владимир Петрович,
доктор биологических наук,
профессор, главный научный сотрудник
Лаборатории молекулярной инженерии
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»
119071 Российская Федерация
г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
vadeiko@yahoo.com
тел.:8(916)614-8932



Вейко В.П.

Подпись Вейко В.П. заверяю
Ученый секретарь
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Кандидат биологических наук

«29» апреля 2021г.



Orlovskiy A.F.