

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение  
высшего образования



«Тульский  
государственный  
университет»  
(ТулГУ)



Проспект Ленина, д. 92, г.Тула, 300012  
Тел. (4872) 73-44-44, факс (4872) 35-81-81  
e-mail: info@tsu.tula.ru, https://tulsu.ru



УТВЕРЖДАЮ  
Проректор по научной  
работе ТулГУ  
доктор технических наук,  
профессор  
Воротилин Михаил Сергеевич

28 ноября 2024 г

№ \_\_\_\_\_  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

**Отзыв ведущей организации на диссертацию  
Плехановой Натальи Сергеевны  
«Влияние процессов N<sub>ε</sub>-ацетилирования белков на регуляцию  
метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах  
аминокислот» на соискание ученой степени кандидата биологических  
наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология**

Диссертация Плехановой Н.С. на тему «Влияние процессов N<sub>ε</sub>-ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах аминокислот» является комплексным исследованием на стыке нескольких взаимосвязанных областей знаний (биохимии, молекулярной биологии, микробиологии, биотехнологии) и имеет большое научное и практическое значение. Это обусловлено как необходимостью разработки современных биотехнологий получения незаменимых аминокислот, так и важностью получением новых знаний о регуляции метаболических потоков у бактерий.

Дополнительное внесение аминокислот в рационы животных является одной из тенденций мирового кормопроизводства. В ближайшие годы включение в комбикорма аминокислот может значительно вырасти, что позволит улучшить конверсию корма, особенно в птицеводстве и свиноводстве. Промышленный микробиологический синтез аминокислот является необходимым условием для получения необходимого количества биологически ценных аминокислот, таких как лизин, метионин, треонин, триптофан. Получение аминокислот микробиологическим способом с

высоким выходом удалось достичь только с помощью специально полученных штаммов. В настоящее время использование методов редактирования генов позволяет улучшить эффективность коммерчески успешных штаммов-продуцентов аминокислот до практически теоретического выхода по производительности. Для поиска новых способов повышения эффективности таких штаммов-продуцентов необходимо искать новые универсальные подходы, способные регулировать пути метаболизма, повышая выход аминокислот. Системная метаболическая инженерия пытается преодолеть это ограничение с помощью комбинированных подходов. Именно такой подход реализован в представленном к защите диссертационном исследовании по разработке основ технологии получения промышленно важной аминокислоты треонина и апробирован дополнительно на штаммах-продуцентах пролина. Главной идеей исследования является выяснение роли N $\epsilon$ -ацилирования ферментов основного метаболизма штаммов-продуцентов на их рост и продукцию целевой аминокислоты. Регуляторная роль ацилирования белков у прокариот продемонстрирована не так давно, поэтому любые исследования в этом направлении позволят получить важные результаты для понимания регуляторных механизмов в метаболизме бактерий (Popova, L.; Carr, R.A.; Carabetta, V.J. Recent contributions of proteomics to our understanding of reversible N $\epsilon$ -lysine acylation in bacteria. *Journal of Proteome Research* **2024**, *23*, 2733-2749, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00912>). Детальное изучение этой посттрансляционной модификации у бактерий позволит разработать новые подходы «тонкой настройки» метаболизма путем влияния на уже синтезированные белки, что имеет большое практическое значение для выявления дополнительных возможностей увеличения производительности штаммов-продуцентов аминокислот. Таким образом, тема диссертационного исследования является **актуальной** как для науки в целом, так и для развития промышленной биотехнологии в нашей стране.

**Научная новизна** этого исследования заключается, прежде всего, в расширении представления о механизмах ацелирования и

деацетилирования аминокислотных остатков лизина в белках *E. coli*. Впервые показана зависимость профиля ацетилирования одного из ключевых ферментов гликолиза — ГАФД- от генотипа штамма, в котором данный белок был синтезирован. Установлено, что способны ацетилироваться ферментативно те аминокислотные остатки лизина, которые не подвержены деацетилированию деацетилазой CobB. Данное наблюдение позволяет выдвинуть гипотезу об ацетилировании некоторых остатков лизина в процессе сборки активных форм ферментов (фолдинга). Автором впервые продемонстрирована возможность комплексного подхода для усовершенствования штаммов-продуцентов аминокислот при использовании как традиционных методов селекции штаммов и методов генной инженерии, так и возможностей процессов ацетилирования белков.

**Практическая значимость** работы очевидна, так как позволяет разрабатывать экономически выгодные технологии микробного синтеза L-треонина на основе полученного штамма *E. coli* при использовании разных источников углерода. Полученные результаты помогут создавать универсальные по потреблению источников углерода штаммы-продуценты, что обеспечит получение целевого продукта независимо от доступности тех или иных субстратов. Результаты работы могут быть использованы для оптимизации существующих технологий и создания новых.

**Достоверность результатов работы.** Полученные результаты базируются на всестороннем анализе приведенных в работе множественных экспериментов. Экспериментальные данные обработаны с использованием математических методов статистической обработки, что обеспечивает достоверность полученных данных. По теме диссертации опубликовано десять научных работ, отражающих основные результаты работы, в том числе пять в изданиях, индексируемых в Web of Science и/или Scopus, остальные - тезисы докладов на профильных научных конференциях разного уровня.

## **Структура диссертационной работы, анализ работы по главам.**

Структура диссертационной работы логична и последовательно раскрывает основные аспекты работы. Язык изложения понятен и доступен, что облегчает восприятие материала.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы (главы I – IV), экспериментальной части - описания объектов и методов исследования ( глава V), результатов и их обсуждения (главы VI – XI), заключения, выводов и завершается списком цитируемой литературы.

Во **введении** дана общая характеристика работы. Перед постановкой цели и задач работы автор кратко поясняет актуальность темы исследования и обосновывает идею данного исследования. Во введении сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость. К сожалению, диссертант докладывал результаты диссертационного исследования на профильных научных конференциях только на последней стадии выполнения работы. Регулярный обмен мнениями о ходе исследования в профессиональном сообществе помогает глубже взглянуть на результаты, чтобы найти закономерности. По результатам исследования опубликовано 4 экспериментальные статьи и обзор в ведущих научных журналах в области биотехнологии, что свидетельствует о высоком уровне научных результатов и их новизне. Обзор по теме исследования является важным этапом работы диссертанта, так как не только позволяет выбрать методы и подходы исследования и провести анализ полученных экспериментальных данных, но и представляет собой важную для других исследователей информацию.

**Обзор литературы** разбит на несколько глав (**Главы I-IV**), каждая из которых посвящена или объектам исследования, или изучаемым в работе биологическим и биотехнологическим процессам. В главе I диссертант описывает методы и подходы для создания штаммов-продуцентов аминокислот и увеличения продукции аминокислот при реализации современных биотехнологий. Важно отметить, что эту информацию можно и

полезно использовать при обучении студентов по направлению подготовки Биотехнология. В главе II суммирована информация о двух штаммах *E.coli*, которые использованы в работе, что необходимо для сравнительного анализа полученных результатов. В главе III приведен анализ известной на данный момент информации по ацетилированию белков у прокариот как способе регуляции метаболизма. Эта глава заканчивается разделом о практическом применении ацетилирования белков у прокариот, в заключении к которой диссертант выделяет нерешенные проблемы в этой области исследования и отмечает перспективы дальнейших исследований для разработки новых подходов «тонкой настройки» метаболизма, путем влияния на уже синтезированные белки. Наконец, в четвертой главе IV излагаются основные сведения об образовании ацетата в процессе культивирования бактерий *E.coli* и способам снижения продукции ацетата, как ингибитора роста бактерий. В этой главе цитируются, в основном, не новые работы. Вероятно, это объясняется тем, что вопрос был основательно изучен ранее. На основании литературного обзора можно судить о высокой компетентности диссертанта, как исследователя-биотехнолога, его умении анализировать современную научную информацию как по биологии (по молекулярной биологии, биохимии, микробиологии), так и по технологии микробного синтеза. Следует пожелать автору на будущее в заключении к литературному обзору обобщать представленную информацию, например, по выбору методов и подходов исследования.

**Экспериментальная часть (Глава V. Объекты и методы исследования).** В этой главе приводится описание бактериальных штаммов и плазмид, используемых в работе (12 штаммов с различными векторами и делециями генов и 10 плазмид на основе 7 плазмидных векторах); методики получения рекомбинантных плазмид, трансформации бактериальных штаммов, идентификация белков методом электрофореза (методы молекулярной биотехнологии); условия культивирования штаммов-продуцентов и оценка их роста (биотехнология); методики по определению

содержания аминокислот в культуральной среде (метод капиллярного электрофореза), активности ферментов и степени ацилирования/деацилирования белков (биохимия); идентификации ацилированных остатков аминокислот (метод ВЭЖХ-МС); методы компьютерного моделирования, в том числе, молекулярный докинг. Используемые диссертантом методы являются современными методами исследований в области молекулярной биотехнологии и биохимии и свидетельствуют в высокой квалификации молодого ученого. Они позволяют в полной мере решить поставленные задачи.

### **Результаты и обсуждение (Главы VI – XI).**

**Глава VI** посвящена изучению влияния процесса ферментативного ацетилирования на продукцию L-треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli*. В начале главы автор описывает теоретический и методический подход, обосновывает выбор объекта исследования. Для этого выбран модельный штамм-продуцент с плазмидой, несущей ген ацетилтрансферазы PatZ в сравнении с бесплазмидным штаммом. Анализ полученных результатов указывает на то, что усиление процесса ферментативного ацетилирования на начальном этапе ферментации положительно влияет на выход треонина.

В **Главе VII** описаны результаты по выяснению влияния процесса деацетилирования на тот же процесс. Для этого использовали две линии экспериментов. Во-первых, методом УФ-мутагенеза получали мутанты, способные расти при высоких концентрациях ацетата. Во-вторых, использовали штаммы-продуценты треонина с плазмидой, несущей ген единственной описанной у *E. coli* деацетилазы. В результате, автору впервые удалось показать, что усиление уровня деацетилирования в клетках позволяет добиться повышения продукции треонина в штамме-продуценте *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода.

**Глава VIII** посвящена изучению ферментов ацетилирования и их влияния на клеточный метаболизм, в том числе на продукцию аминокислот. Автор использовал неудачное название главы, так как влияние

ферментативного ацетилирования на продукцию треонина уже описано в главе VI. Тем не менее, в этой части работы поставлен другой эксперимент, в котором использовали штаммы с делецией генов, кодирующих деацетилазу, ацетилтрансферазу и ацетаткиназу. На основании полученных результатов автор выдвинул некоторые гипотезы, которые могут стать отправной точкой для дальнейших исследований.

В главе IX представлены результаты экспериментов по влиянию ацетилирования на активность ключевого фермента катаболизма глюкозы – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) в экспериментах *in vivo* (ростовые параметры штаммов-продуцентов аминокислот) и *in vitro* (выяснение механизма ацетилирования – ферментативный или неферментативный).

В главах X-XI приведены результаты определения активности ГАФД в ацетилированной и неацетилированной формах, роль неферментативного ацетилирования и клеток-продуцентов на активность фермента. Результаты обсуждаются, в том числе, с позиций молекулярного докинга для выяснения положения остатков лизина, по которым возможно ацетилирование.

В заключении диссертант еще раз обосновывает актуальность проведенного исследования и отмечает роль полученных результатов для науки и практики, намечает дальнейшие возможные пути развития этого исследования. В конце представлены **выводы**, подтверждающие, что поставленные задачи решены. Таким образом, проведено всестороннее исследование по разработке теоретических основ комплексного подхода для усовершенствования штаммов-продуцентов аминокислот, основанного как традиционных методах селекции штаммов и методов генной инженерии, так и возможностях процессов ацетилирования.

По диссертационной работе возникли вопросы и замечания, некоторые из которых отмечались выше:

1. Несмотря на значительный список цитируемой литературы (220 источников), только 10% ссылок на научные публикации за последние 5 лет,

и не более 10 источников (включая статьи автора) – за последние 3 года. Чем обусловлено это обстоятельство? Возможно, пока не очень много исследовательских групп занимаются этой тематикой из-за того, что ацетилирование у прокариот было обнаружено недавно?

2. Одно из положений научной новизны, сформулированное автором звучит так: «Обнаружено, что удаление генов, участвующих в метаболизме ацетата и ацетилировании  $\epsilon$ -аминогруппы лизина белков влияет на метаболизм штаммов-продуцентов и на продуктивность целевых аминокислот». В тоже время в выводе содержится противоположное заключение: «Установлено, что ферменты, участвующие в процессах ацетилирования, не являются жизненно важными для клеток *E. coli*, однако их делеции приводят к снижению скорости роста и накоплению биомассы штаммами, однако в случае штаммов-продуцентов аминокислот не приводят к снижению уровня продукции L-треонина и L-пролина». Как автор объяснит это противоречие?

3. Название Главы VIII «Влияние ферментов, участвующих в процессах ацетилирования на клеточный метаболизм и продукцию аминокислот» неудачное, так как в названии главы VI «Влияние процесса ферментативного ацетилирования на продукцию L-треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli*» тот же предмет исследования. Как автор объяснит это?

4. Диссертантом проделала большая теоретическая и экспериментальная работа, получен большой массив результатов. Для лучшего понимания целостности работы, наглядного представления взаимосвязи полученных результатов и найденных закономерностей автору следовало изложить логику исследования и полученных результатов в виде блок-схемы, что значительно упростило бы анализ и обобщение информации для научного сообщества.

5. По тексту иногда встречаются опечатки, чего, вероятно, очень сложно избежать в любой работе.

Перечисленные вопросы и замечания не снижают общего прекрасного впечатления от работы. Результаты, изложенные в диссертации,



опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

### **Заключение**

Диссертация Плехановой Натальи Сергеевны является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи, связанной с разработкой штаммов-супер-продуцентов и усовершенствования технологий микробного синтеза для увеличения продукции промышленно ценных аминокислот. Содержание диссертации в полной мере соответствует специальности 1.5.6 Биотехнология (п.1. Молекулярная биотехнология, генетическая и метаболическая инженерия. п.8. Промышленная биотехнология, включая создание и применение промышленных микробных продуцентов). Автореферат и опубликованные автором статьи полностью отражают содержание диссертации.

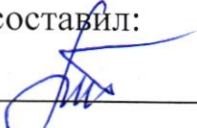
Полученные в диссертации результаты можно рекомендовать для разработки новых технологий микробного биосинтеза для получения промышленно ценных аминокислот после защиты созданных диссертантом продуктов интеллектуальной собственности, например, разработанных способов регулирования активности рекомбинантных ферментов, а также новых методов для получения L-аминокислот. Результаты рекомендовано внедрить в образовательных организациях высшего профессионального образования, которые занимаются обучением студентов по направлению *Биотехнология* (разных уровней образования) или по смежным специальностям естественно-научного направления; в ведущих научных центрах РФ, институтах РАН биологического профиля, например, НИЦ «Курчатовский институт» (Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Институт молекулярной генетики), Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущинский научный центр биологических исследований (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.А. Скрабина РАН), Пермский федеральный

исследовательский центр УрО РАН (Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН) и др.

По актуальности, объему выполненных работ, научной новизне, теоретической и практической значимости, уровню обсуждения результатов и полученных выводов работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления от 25.01.2024), а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Диссертационная работа Плехановой Натальи Сергеевны заслушана и обсуждена на совместном заседании кафедр химии, биотехнологии и биологии естественно-научного института ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» (протокол № 2 от 01.11.2024 г.).

Отзыв составил:



Понаморева Ольга Николаевна

Заведующий кафедрой биотехнологии,  
ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»  
доктор химических наук  
по специальности 03.06.01 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии),  
доцент

**Полное название организации:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет»

**Почтовый адрес:** 300012 г.Тула, пр. Ленина, 92.

тел. +7 4872 73-44-44

факс +7 4872 35-81-81

E-mail: [info@tsu.tula.ru](mailto:info@tsu.tula.ru)

