

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, Егорова Сергея Николаевича, на диссертационную работу Дербикова Дениса Дмитриевича "Аспартат-аммоний-лиазы бактерий: генетическое конструирование штаммов с измененными каталитическими свойствами и их применение в биотехнологии", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Диссертационная работа Дербикова Дениса Дмитриевича посвящена созданию новых бактериальных штаммов, синтезирующих аспарагиновую кислоту с помощью ферментов аспартат-аммиак-лиаз (аспартаз), с целью использования их в промышленных условиях.

Производство аминокислот с помощью микроорганизмов является перспективным направлением развития промышленной биотехнологии. Многие аминокислоты, включая лизин, аспарагиновую кислоту, треонин, валин и другие получают с помощью микроорганизмов. Альтернативой микробиологическому способу является химический синтез. Однако при этом образуется смесь D- и L-аминокислот. Наибольший интерес для промышленности представляют L-аминокислоты, поэтому получающуюся смесь приходится разделять. Также, химический синтез обычно протекает в экстремальных условиях, при высокой температуре и давлении, при этом образуется много побочных продуктов, которые необходимо утилизировать. В связи со всем вышеперечисленным, микробиологический способ получения аминокислот является предпочтительным.

Фермент аспартат-аммиак-лиаза катализирует обратимую реакцию присоединения иона аммония к фумаровой кислоте по двойной связи с выходом L-аспарагиновой кислоты. Этот фермент в течение довольно продолжительного времени используется при промышленном способе получения аспарагиновой кислоты. Кроме того, активность этого фермента влияет на содержание в клетке аспарагиновой кислоты, являющейся интермедиатом синтеза других аминокислот аспарагинового семейства.

Получение новых штаммов для промышленного получения аминокислот является важной задачей биотехнологии. В связи с этим, актуальность выбранной темы не подлежит сомнению.

Диссертационная работа Дебрикова Д.Д. написана по традиционному плану, она изложена на 123 страницах печатного текста и содержит введение, обзор литературы, экспериментальную часть, включающую описание материалов и методов, использованных в работе, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 113 публикаций. Диссертация хорошо иллюстрирована, содержит 16 таблиц и 39 рисунков и одно приложение.

Цели, задачи, новизна и практическая значимость исследования четко изложены во введении. Также во введении приведены основные положения, выносимые на защиту.

В диссертации представлен обзор литературных данных, освещающих широкий круг вопросов, связанных с экспериментальной частью диссертации. Обзор литературы состоит из двух частей. Первая посвящена обзору и сравнению основных свойств аспартаз, выделенных из различных микроорганизмов. В данном разделе описана структура этого фермента, выделенного из различных микроорганизмов, рассмотрен каталитический механизм действия фермента. Вторая глава посвящена применению ферментов аспартаз в промышленности, в частности при получении L-аспарагиновой кислоты биотехнологическим методом. Также, в данной главе намечаются некоторые направления промышленной биотехнологии, в которых возможно было бы использование данного фермента.

В разделе "Материалы и методы" подробно описаны современные генноинженерные методики исследования, приведены списки использованных в работе штаммов микроорганизмов и плазмидных векторов. Последовательность олигонуклеотидов, использованных в работе, представлена в приложении в виде таблицы. Также в этом разделе описываются методы иммобилизации клеток, методы ВЭЖХ, метод электрофоретического разделения белков, метод определения аспартазной активности и методы определения некоторых кинетических характеристик фермента. Хочется отметить четкое и подробное изложение методов

исследования, что позволит повторить их в других исследованиях. Содержание раздела свидетельствует о высоком методическом уровне работы.

В главе «Результаты и обсуждение» последовательно представлены все результаты, полученные на каждом этапе работы, а также анализ полученных данных. Глава состоит из пяти разделов. Первый раздел посвящен сравнительному изучению каталитических свойств аспартаз, выделенных из различных источников. По результатам сравнительного анализа аспартазной активности автором для дальнейшей работы выбирается фермент из *E.coli*, как обладающий максимальной удельной активностью. В следующем разделе автором проводится сравнение основных подходов к повышению аспартазной активности. Автор использует подходы, включающие экспрессию гена аспартазы в составе плазмиды, замену промотора и экспрессию гена аспартазы в геномной ДНК бактерий и получение мутантных форм аспартазы. В результате Дербигов Д.Д. останавливается на подходе, основанном на замене промотора гена аспартазы на сильный промотор Т-нечетных фагов. В третьем разделе описано получение штаммов *E.coli* с удалением генов, кодирующих ферменты фумаразы. При биокаталитическом получении аспарагиновой кислоты с помощью фумараз образуется яблочная кислота, являющаяся побочным продуктом. В разделе 3 описывается получение штаммов с делециями генов фумараз, а также проводится их сравнение. На основании выполненных исследований делается заключение, что при синтезе аспарагиновой кислоты для снижения содержания в реакционной смеси яблочной кислоты достаточно делетировать ген *fumC*. Отдельная, и, на мой взгляд, наиболее важная с практической точки зрения часть работы Дербикова Д.Д. посвящена конструированию штамма-продуцента для биокаталитического получения L-аспарагиновой кислоты. В ней описано получение модифицированных штаммов *E.coli* с высокой аспартазной и низкой фумаразной активностями. На основе данных штаммов получены образцы биокатализаторов с иммобилизованными клетками *E.Coli*, показывающие высокий на уровне мировых аналогов синтез аспарагиновой кислоты. В последнем разделе автор предпринял попытку исследовать влияние аспартазы на уровень биосинтеза лизина. Показано, что увеличение аспартазной

активности в штаммах *Corynebacterium glutamicum* не приводит к увеличению количества получаемого лизина.

В заключительной главе подведены итоги проведенной работы. Обоснованность и достоверность полученных Дербиковым Д.Д. данных не вызывает сомнений. Выводы диссертации, выносимые на защиту, базируются на полученных результатах работы, обоснованы и достоверны.

В целом можно сказать, что автор полностью выполнил намеченные эксперименты и решил все поставленные задачи. Им получены штаммы микроорганизмов, которые успешно прошли промышленные испытания и продемонстрировали высокий уровень синтеза аспарагиновой кислоты.

Диссертационная работа написана понятным литературным языком, хорошо структурирована, снабжена аккуратными рисунками и понятными таблицами. Тем не менее, в работе встречаются опiski и лабораторные жаргонные выражения. В качестве примера можно привести выражения: “сухой вес”, “LB чашки”, “манипуляции с белками и нуклеиновыми кислотами”. В качестве замечания можно отметить небрежное написание списка сокращений.

Однако, отмеченные недостатки рассматриваемой работы не существенны и не влияют на общую высокую оценку.

Соискателем проделана большая и серьезная работа по изучению ферментов аспартат-аммиак-лиаз и использованию этих ферментов в промышленной биотехнологии. На основе штаммов *E. coli* получены биокатализаторы синтеза L-аспарагиновой кислоты, существенно превосходящие применяемые в данное время. В целом, диссертация Дербикова Д.Д. «Аспартат-аммоний-лиазы бактерий: генетическое конструирование штаммов с измененными каталитическими свойствами и их применение в биотехнологии» является самостоятельным и законченным научным исследованием. По результатам диссертационной работы опубликовано 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, а также получено 2 патента. Результаты представленного исследования докладывались на российских и международных конференциях. Автореферат отражает содержание диссертации.

Актуальность, научная новизна и практическая значимость проведенных в работе исследований полностью соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Дербиков Денис Дмитриевич, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Доцент кафедры молекулярной биологии
биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»,
доктор биологических наук
5 марта 2018 года

Подпись С.Н. Егорова заверяю,
секретарь Ученого Совета биологического
факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по кандидатской диссертации Дербикова Дениса Дмитриевича «Аспартат-аммоний-лиазы бактерий: генетическое конструирование штаммов с измененными каталитическими свойствами и их применение в биотехнологии», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «Генетика» (биологические науки)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Основные работы
Егоров Сергей Николаевич	РФ	Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии. Доцент	Доктор биологических наук	1. Shnyreva M.G., Petrova E.V., Egorov S.N., Hinnen A. (1996). "Biochemical Properties and Excretion Behavior of Repressible Acid Phosphatases with Altered Subunit Composition", Microbiol. Res., 151, 291-300. 2. Е.И.Блинникова, Ф.Л.Мирющенко, Ю.А.Шабалин, С.Н.Егоров.(2002), "Везикулярный транспорт внеклеточных кислых фосфатаз у дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ." Биохимия, 67, вып.4. 3. . Арзуманян И.С. Егоров С.Н, Кузнецов С.А., Яминский И.В.. (2016). «Исследование характера агрегации репрессибельной кислой фосфатазы и её гомометных форм (PHO5, PHO10 и PHO11) методом атомно-силовой микроскопии. В журнале: «Медицина и высокие технологии», №2, стр. 29-34.

Доцент

Кафедра молекулярной биологии, биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова.

Москва, 119234, Ленинские горы дом 1 стр. 12

Телефон 495- 939-27-76

e-mail: sergey.n.egorov@mail.ru

Доктор биологических наук, доцент

Егоров С.Н.

