

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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 является продолжением многолетних исследований, проводимых в Лаборатории молекулярной биотехнологии НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика по получению штаммов-продуцентов для производства L-аспарагиновой кислоты. Она посвящена изучению фермента аспартат-аммоний-лиазы, имеющего важное значение в катаболизме аспарагиновой кислоты в клетках.

В настоящее время в мире растет производство аминокислот, которые широко востребованы в различных областях промышленности. Многие из аминокислот получают микробиологическими способами, которые имеют ряд преимуществ перед традиционным химическим синтезом, и главным из них является получение аминокислот в биологически активной L-форме. Бактериальный фермент аспартат-аммоний-лиаза, катализирующий в зависимости от условий реакцию аминирования фумарата или дезаминирования аспарагиновой кислоты, обладает значительным потенциалом при производстве L-аспарагиновой кислоты, поэтому метаболическая инженерия микробных штаммов, направленная на увеличение уровня аспартазной активности с одновременным понижением фумаразной активности является своевременной биотехнологической задачей. Таким образом, актуальность диссертационной работы Дербикова Д.Д. «Аспартат-аммоний-лиазы бактерий: генетическое конструирование штаммов с измененными каталитическими свойствами и их применение в биотехнологии» не вызывает сомнений и поставленные в ней цели и задачи являются значимыми в сфере биотехнологии и катализа.

Научная новизна диссертационной работы Дербикова Д.Д.

заключается в комплексном подходе к получению модифицированных штаммов бактерий *Escherichia coli*, в которых впервые deletированы гены фумараз (*fumA*, *fumB*, *fumC*), что позволило повысить эффективность биоконверсии фумарата аммония в L-аспарагиновую кислоту. Одновременно, в штамме *E.coli* было проведено замещение промотора гена аспартазы на более сильный промотор фага T5, что привело к значительному повышению уровня аспартазной активности. Применение данных подходов позволило получить рекомбинантные штаммы с повышенной аспартазной и пониженной фумаразной активностью, на основе которых были созданы и апробированы образцы промышленных биокатализаторов, что имеет несомненную **практическую значимость**.

Диссертация Дербикова Д.Д. построена по традиционной схеме и изложена на 123 страницах печатного текста, содержит 16 таблиц и 39 рисунков, а также одно Приложение. Библиографический указатель насчитывает 113 источников литературы и включает современные публикации отечественных и зарубежных авторов. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложения».

Во «Введении» (стр. 6-9) автор определяет проблематику исследования, а также поставленную задачу работы, ее новизну и практическую значимость, достоверность полученных результатов, положения, выносимые на защиту, а также приводит данные о публикации результатов исследования и их апробации.

Глава «Обзор литературы» (стр. 10-41) состоит из 2 частей. Первая часть посвящена обзору многообразия ферментов аспаратат-аммоний-лиаз и их биохимическим свойствам. В разделе подробно представлена структура этого фермента из различных источников, а также каталитический механизм действия аспартазы. Вторая часть посвящена обзору применения ферментов

аспартаз в промышленной биотехнологии. В обзоре значительное внимание уделено процессу производства L-аспарагиновой кислоты. Автор рассматривает различные способы получения этой аминокислоты и делает вывод, что биокаталитический способ является предпочтительным. Несмотря на краткость изложения, обзор литературы вполне аргументированно обосновывает выбранное направление работы.

В главе «Материалы и методы» (стр. 42-56), содержится подробное описание всех использованных в работе методов – микробиологических, биохимических, а также молекулярно-генетических. Содержание раздела свидетельствует о высоком методическом уровне работы. Все методики тщательно описаны и могут быть воспроизведены.

Высокий уровень экспериментальных исследований и использование статистической обработки полученных результатов подтверждают **достоверность приведенных в диссертации результатов.**

Глава «Результаты и обсуждение» (стр. 57-105) состоит из пяти разделов, которые выстроены логично и позволяют оценить уровень и глубину проведенных диссертантом исследований

Раздел 1 (стр. 57-69) посвящен клонированию генов трех аспартаз из бактерий *E.coli*, *Bacillus sp.* YM55-1 и *Corynebacterium glutamicum*, анализу структуры генов, а также их экспрессии в штамме *E.coli* BLR(DE3). Далее, в данном разделе проводится сравнительное изучение каталитических и физико-химических свойств различных рекомбинантных аспартаз: определены удельные активности ферментов, термостабильность, определена Км по L-аспарагиновой кислоте. Показано, что аспартаза из *E.coli* обладает максимальной удельной активностью, что является преимуществом для использования этого фермента в качестве биокатализатора в процессе синтеза L-аспарагиновой кислоты.

В Разделе 2 (стр. 70-79) проведено сравнение 3-х различных генетических подхода к повышению аспартазной активности рекомбинантных штаммов: амплификация гена аспартазы в составе

мультикопийных плазмид, усиление экспрессии гена аспартазы в составе хромосомы за счет замены собственного промотора гена на более сильный промотор, получение мутантных вариантов аспартазы с повышенной удельной активностью. Диссертантом были применены все три метода и сделан вывод о том, что стратегия повышения аспартазной активности за счет использования более сильных промоторов из Т-нечетных фагов является наиболее эффективной.

В Разделе 3 (стр. 80-88) описывается получение штаммов *E. coli* с делетированными генами фумараз, которые участвуют в побочном процессе превращения фумарата в яблочную кислоту, тем самым снижая концентрацию исходного субстрата в процессе синтеза L-аспарагиновой кислоты. В ходе работы диссертантом было получено пять штаммов с делециями различных генов фумараз. В приведенном разделе подробно описывается процесс получения каждого штамма и убедительно доказывается, что для снижения содержания яблочной кислоты достаточно удаления гена *fumC*, кодирующего фумаразу, работающую в условиях избытка кислорода.

Наиболее значимым разделом Главы «Обсуждение результатов» является Раздел 4 (стр. 89-95), посвященный получению промышленных штаммов-биокатализаторов для синтеза L-аспарагиновой кислоты, что определяет практическую значимость диссертационной работы Д. Д. Дербикова. В Разделе 4 диссертант сочетает подходы, описанные в Разделах 2 и 3, для получения рекомбинантных штаммов, удовлетворяющих условиям промышленного применения, т.е. объединяет в одном штамме и замену гомологичного промотора гена *aspA* на конститутивный фаговый промотор и делетирует гены фумараз в различном сочетании. Раздел 4 является прекрасным примером применения современных методов метаболической инженерии для конструирования новых рекомбинантных штаммов, востребованных промышленной биотехнологией. На основе новых штаммов были получены биокатализаторы BD12 и BD13, время полуинактивации которых составило 150 суток, что на 60 суток больше, чем полуинактивация

используемого ранее биокатализатора в аналогичных процессах. Более того, продуктивность BD12 и BD13 была более 1400 кг L- аспарагиновой кислоты на 1 кг биокатализатора, что в 7 раз превысило продуктивность базового БК.

В Разделе 5 (стр. 96-100) автор исследует влияние бактериальной аспартазы *aspA* из *E.coli* на уровень биосинтеза лизина в штамме *Corynebacterium glutamicum*. Показано, что добавление в среду фумарата аммония увеличивало образование лизина. При этом, в случае штаммов с высокой аспартазной активностью в среде накапливался аспартат, а не лизин, что указывало на наличие лимитирующей стадии превращения аспартата в лизин.

Таким образом, разработанные диссертантом новые промышленные биокатализаторы на основе рекомбинантных штаммов *E.coli* с увеличенной аспартазной и сниженной фумаразной активностями являются более эффективными, чем контрольные образцы, не обладают токсичностью и могут быть рекомендованы для использования в технологии получения L-аспарагиновой кислоты.

Работа является весьма объемным исследованием и производит хорошее впечатление. Она хорошо оформлена, в основном не содержит опечаток.

К работе могут быть сформулированы следующие замечания:

- 1) Название диссертационной работы подразумевает, что аспартаза может использоваться в различных областях промышленной биотехнологии. Однако во второй части литературного обзора подробно описывается получение аспарагиновой кислоты, вскользь упоминается получение лизина и практически ничего не говорится о получении других соединений.
- 2) Логично было бы выделить описание и сравнение физико-химических свойств рекомбинантных аспартаз а отдельный раздел Главы «Обсуждения результатов». В диссертации эти результаты совмещены с клонированием генов аспартаз в Разделе 1.

- 3) Сравнение основных свойств аспартаз лучше было бы проводить на гомогенных ферментах, а не на бесклеточных экстрактах.
- 4) Интересно было бы оценить результаты совмещения подходов увеличения аспартазной активности, таких как замена слабого промотора на более сильный и получение мутантной формы аспартазы. Возможно, это привело бы к еще большему увеличению аспартазной активности.
- 5) В Разделе 4 Главы «Обсуждение результатов» для сравнения берется биокатализатор, иммобилизованный в полиакриламиде; а полученные штаммы иммобилизуются в полиэтиленимине. Корректнее было бы их иммобилизовать в одинаковых условиях. Возможно, это различие и объясняет увеличение периода полуинактивации БК.

Однако указанные замечания ни в коей мере не снижают общего положительного впечатления, сложившегося при анализе диссертационной работы Д. Д. Дербикова.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 6 публикациях, в том числе 2 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 2 тезисах в сборнике материалов конференций и 2 патентах.

Таким образом, по критериям актуальности, научной новизны и практической значимости представленная к защите диссертация «Аспартат-аммоний-лиазы бактерий: генетическое конструирование штаммов с измененными каталитическими свойствами и их применение в биотехнологии» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 (Постановление Правительства РФ № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 года), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Дербиков Денис Дмитриевич заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «Генетика».

Автореферат и опубликованные работы отражают основное содержание диссертации.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник Лаборатории биотехнологии ферментов
ФИЦ Биотехнологии РАН
Кандидат химических наук

Рожкова Александра Михайловна

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Адрес: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2

Телефон: 8-910-464-47-91,

E-mail: amrojкова@mail.ru

✓



СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по кандидатской диссертации Дербикова Дениса Дмитриевича «Аспаргат-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
Рожкова Александра Михайловна	РФ	Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук" (ФИЦ Биотехнологии РАН), старший научный сотрудник	Кандидат химических наук	1. Volkov P. V., Rozhkova A. M., Gusakov A. V., Sinityn A. P. Homologous cloning, purification and expression of highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) from <i>Penicillium canescens</i>. Protein Expression and Purification, 2014, v.103, p.1-7 2. Sinityn A.P. and Rozhkova A.M., <i>Penicillium canescens</i> host as the platform for development of a new recombinant strains producers of carbohydrases, Microbiology Monographs, «Microorganisms in Biorefineries», Ed. B. Kamm, Springer, 2015, p.1-19, ISSN 1862-5576, ISBN 978-3-662-45208-0, DOI 10.1007/978-3-662-45209-7, 3. Volkov P. V., Rozhkova A. M., Gusakov A. V., Zorov I. N., Sinityn A. P., Glucoamylases from <i>Penicillium verticilliosum</i> and <i>Myceliophthora thermophila</i>: analysis of differences in activity against polymeric substrates based on 3D model structures of the intact enzymes, Biochimie, 2015, v.110, p.45-51 4. Dotsenko G. S., Gusakov A. V., Rozhkova A. M., Korotkova O. G., Sinityn A. P., Heterologous beta-glucosidase in a fungal cellulase system: comparison of different methods for development of multi-enzyme cocktails, Process Biochemistry, 2015, v.50, p.1258-1263 5. Volchok A., Rozhkova A., Zorov I., Scherbakov S., Sinityn A. Production of fruit wines using novel enzyme preparations, Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, (J.Int.Sci. Vigne Vin), 2015, v.49, p.205-215 6. Carlos Martin, Pavel V. Volkov, Aleksandra M. Rozhkova, Jürgen Puls, Arkady P. Sinityn, Comparative study of the enzymatic convertibility of glycerol- and dilute acid-pretreated sugarcane bagasse using <i>Penicillium</i>- and <i>Trichoderma</i>-based cellulase preparations. Industrial Crops and Products 77 (2015) 382-390 7. Dotsenko A. S., Gusakov A. V., Volkov P. V., Rozhkova A. M., Sinityn A. P. N-Linked glycosylation of recombinant cellobiohydrolase I (Cel7A) from <i>Penicillium verticilliosum</i> and its effect on the enzyme activity,

				Biotechnol.Bioengineering. 2016, v.113, No2, p.283-291 8. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Sinitsyna O.A., Nemashkalov V.A., Sinitsyn A.P. Effect of N-linked glycosylation on the activity and other properties of recombinant endoglucanase IIa (Cel5A) from <i>Penicillium verticilliosum</i>. Protein Engineering, Design & Selection, 2016, v.29, No.11, p.495-501 9. Bulakhov A.G., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., Nemashkalov V.A., Sinitsyn A.P. Using an inducible promoter of a gene encoding <i>Penicillium verticilliosum</i> glucosylase for production of enzyme preparations with enhanced cellulase performance, PLOS ONE, 2017 Jan 20;12(1):e0170404 10. Gusakov A.V., Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. N-Linked glycans are an important component of the processive machinery of cellobiohydrolases. Biochimie, 2017, v.132, p.102-108 11. Denisenko Y.A., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Osipov D.O., Zorov I.N., Matys V.Y., Urolov I.V., Sinitsyn A.P.Site-directed mutagenesis of GH10 xylanase A from <i>Penicillium canescens</i> for determining factors affecting the enzyme thermostability, International Journal of Biological Macromolecules, 2017, v.104, p.665-671
--	--	--	--	---

Старший научный сотрудник Лаборатории биотехнологии ферментов
 Федеральное государственное учреждение "Федеральный исследовательский центр
 "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук" (ФИЦ Биотехнологии РАН)
 119071, г. Москва, Ленинский проспект 33, стр. 2
 Тел. 89104644791
 e-mail: amojkova@mail.ru
 Кандидат химических наук