

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)**

142290, Московская обл., г. Пушкино, просп. Науки, д. 5
Тел./факс: (495) 956-33-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru, <http://www.ibpm.ru>
ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОГРН 1025007771491, ОКПО 02699702, ОКВЭД 73.10, ОКОПФ 20903
Отдел №34 УФК по Московской области (ИБФМ РАН лицевой счет 20486Ц87560)
Р/с 40501810300002000104 в Отделении 1 Москва; БИК 044583001

14.02.2018 № 114-03.4-3/18

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук
Б.Н. Деонтьевский А.А.

_____ 2018г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию 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)

1. Актуальность темы выполненной работы

Диссертация Дербикова Д.Д. является исследовательской работой, посвященной
решению важной научно-практической задачи биотехнологии – разработке новых

способов получения аминокислот. Аминокислоты являются одним из важнейших продуктов современного микробного синтеза и активно используются в медицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности.

В мире происходит рост рынка аминокислот, что определяет растущую потребность в увеличении эффективности их производства. Поэтому получение новых штаммов-продуцентов аминокислот является актуальной задачей. Одним из наиболее эффективных способов создания новых продуцентов является генная инженерия. Конструирование продуцентов аминокислот путем вставки в их геном новых генов, изменения регуляторных участков генов, изменения активности отдельных ферментов позволяет получить высокий выход продукта с большой степенью чистоты. Таким образом, результаты, полученные автором, являются актуальными и своевременными и вносят существенный вклад в развитие биотехнологии микробных препаратов.

2. Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов.

Исследования, проведенные автором, выполнены на высоком методическом уровне. Научную новизну диссертационной работы определяют следующие результаты исследования.

Автор провел сравнительную характеристику аспартаз из различных источников и выяснил, что наиболее эффективным подходом к повышению аспартазной активности является замена промотора гена на промотор Т-нечетных фагов.

Обнаружено, что делетирование генов фумараз из генома штаммов *E. coli* уменьшает образование яблочной кислоты, загрязняющей препараты аминокислот при производстве.

На основе штаммов с высокой аспартазной и низкой фумаразной активностью сконструированы эффективные продуценты L-аспарагиновой кислоты.

Обнаружено, что увеличение экспрессии аспартазы не приводит к увеличению продукции лизина штаммами-продуцентами.

3. Достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций.

Для достижения целей исследования автором были поставлены адекватные задачи, которые удалось

Достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций обеспечивается большим числом проведенных экспериментов, использованием методов, адекватных поставленным задачам. Для обработки полученных результатов автор использовал методы статистической обработки результатов исследований. Выводы, сделанные Дербиковым Д.Д., содержательны и полностью соответствуют поставленным задачам.

4. Значимость полученных результатов для науки и производства

Значимость диссертационного исследования Д.Д. Дербикова для науки и промышленности определяется тем, что автором впервые проведено как фундаментальное исследование регуляции продукции L-аспарагиновой кислоты в генетически модифицированных штаммах, так и предложены способы биотехнологического применения полученных результатов. Хочется отметить, что диссертация представляет собой законченную работу – проведены исследования фундаментальных основ синтеза L-аспарагиновой кислоты, а затем, предложены способы практического использования фундаментальных результатов.

Практическая значимость работы, подтвержденная выдачей патентов РФ, состоит в разработке штаммов бактерий, предназначенных для промышленного получения L-аспарагиновой кислоты.

5. Рекомендации по использованию результатов и выводов.

Полученные Д.Д. Дербиковым результаты могут быть использованы как для проведения фундаментальных исследований, так и для разработки новых технологий получения аминокислот, в частности для получения биокаталитическим способом L-аспарагиновой кислоты. Результаты исследований значимости аспартазы и фумаразы в трансформации аспарагиновой кислоты и их участие в функционировании цикла трикарбоновых кислот могут быть использованы в изучении регуляции метаболизма аминокислот, а так же в лекциях, практических занятиях по биохимии. Разработанные автором подходы работы с генами фумараз и аспарагиназ позволяют разработать новые эффективные технологии получения аминокислот.

6. Оценка содержания диссертации, замечания по оформлению

Структура диссертационной работы стандартна и состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, включающей описание Материалов и методов, Результаты и обсуждения, Заключение, Выводов, Списка использованной литературы (113 источников) и Приложения.

Обзор литературы в полной мере освещает вопросы, касающиеся темы исследования. Он состоит из двух глав. Первая посвящена обзору ферментов аспартаз, их структуре и их биохимическим свойствам. Вторая глава описывает применение аспартаз в промышленности, в частности, для получения L-аспарагиновой кислоты.

В главе Материалы и методы исследования все применяемые методики описаны подробно, что позволяет воспроизвести их. Применяемые методы адекватны поставленным задачам исследования. Работа проведена на современном методическом уровне с использованием различных методов генетической инженерии, биохимии и молекулярной генетики.

Приведенные в работе научные положения и выводы аргументированы, основаны на общепринятых теоретических закономерностях и опираются на экспериментальные данные. В работе нет взаимно противоречивых выводов.

Однако, отмечая достоинства диссертационной работы и ее практическую значимость, следует указать на некоторые спорные положения и высказать **замечания**:

1. Насколько оправдано создание продуцента на основе *E. coli*? Данная бактерия относится к IV группе патогенности. Соответственно этот факт предъявляет повышенные требования в подготовке персонала, утилизации отходов, санитарной зоне предприятия.

2. Непонятно, каким образом производилось определение величины K_m , то есть, каким способом проводилась линеаризация результатов, какие концентрации субстрата использовались, или расчёт проводили методом нелинейной регрессии с помощью компьютерных программ? Почему автор указывает в работе только величину K_m , но не $V_{\max}$ или k_{cat} ? Тем более, что и K_m , и $V_{\max}$ (k_{cat}) рассчитываются на основании одних и тех же экспериментальных данных.

3. В тексте присутствуют небольшие небрежности в представлении материала, что несколько затрудняет восприятие материала. Например, таблицы 4.2, 4.7, 3.2 разделены на две странички, хотя их вполне можно разместить на одной странице. Так же у рисунка 3.1 подпись так же разбита на две странички.

Вместе с тем, стоит отметить, что указанные замечания не снижают ценности диссертационной работы, не влияют на главные результаты работы и носят рекомендательный характер.

Основные положения работы доложены на Всероссийских конференциях. По теме диссертации опубликованы две работы в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, получено два патента РФ. Содержание автореферата и печатных работ соответствует материалам диссертации.

7. Заключение.

Диссертационная работа Дениса Дмитриевича Дербикова «Аспартат-аммоний-лиазы бактерий: генетическое конструирование штаммов с измененными каталитическими свойствами и их применение в биотехнологии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием по актуальной теме, результаты которой имеют существенное значение для современной генетики и биотехнологии.

По актуальности, научной новизне, фундаментальной и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Дербикова Дениса Дмитриевича соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёной степени», утверждённого постановлением правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор, Дербиков Денис Дмитриевич, заслуживает присуждение учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «Генетика» (биологические науки)

Отзыв на диссертацию обсуждён на совместном семинаре Лаборатории микробной энзимологии и Лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН (протокол № 1 от 06.02.2018)

Заведующий Лаборатории
аэробного метаболизма
микроорганизмов, д.б.н.

Моргунов И.Г.



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)**

142290, Московская обл., г. Пушкино, просп. Науки, д. 5

Тел./факс: (495) 956-33-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru, <http://www.ibpm.ru>
ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОГРН 1025007771491, ОКПО 02699702, ОКВЭД 73.10, ОКОПФ 20903
Отдел №34 УФК по Московской области (ИБФМ РАН лицевой счет 20486Ц87560)
Р/с 40501810300002000104 в Отделении 1 Москва; БИК 044583001

14.02.2018 № 114-03-4-3/14

На № _____ от _____

Председателю совета
по защите диссертаций Д217.013.01
д.б.н., профессору, академику РАН Дебабову В.Г.

Уважаемый Владимир Георгиевич!

В ответ на Ваше письмо № ЯА4000.01.2/48 от 01.02.2018 г. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук выражает согласие выступить в качестве ведущей организации по диссертации Дербикова Дениса Дмитриевича на тему: «Аспартат-аммоний-лиазы бактерий: генетическое конструирование штаммов с измененными каталитическими свойствами и их применение в биотехнологии» по специальности 03.02.07 – «Генетика» (биологические науки), представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Сообщаем следующие сведения, направляемые в Министерство образования и науки Российской Федерации:

Официальное полное наименование: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

Сокращенное наименование: ИБФМ РАН

Почтовый адрес: 142290 Московская обл., г. Пушкино, пр-т Науки д 5

Телефон: +74959563370

Факс: +74959563370

E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru

Сайт: <http://ibpm.ru/>

Директор ИБФМ РАН: д.б.н., Леонтьевский А.А.

Список основных публикаций сотрудников ведущей организации в рецензируемых изданиях по теме исследования за последние 5 лет:

1. Agafonova N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A., Doronina N.V. *Ancylobacter sonchi* sp. nov., a novel methylotrophic bacterium from roots of *Sonchus arvensis* L. // Int J Syst Evol Microbiol. 2017;67(11):4552-4558
2. Lisov A.V., Belova O.V., Lisova Z.A., Vinokurova N.G., Nagel A.S., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Budarina Z.I., Nagornykh M.O., Zakharova M.V., Shadrin A.M., Solonin A.S., Leontievsky A.A. Xylanases of *Cellulomonas flavigena*: expression, biochemical characterization, and biotechnological potential. // AMB Express. 2017;7(1):5.
3. Ermakova I.T., Shushkova T.V., Sviridov A.V., Zelenkova N.F., Vinokurova N.G., Baskunov B.P., Leontievsky A.A. Organophosphonates utilization by soil strains of *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. // Arch Microbiol. 2017;199(5):665-675.
4. Ibryashkina E.M., Solonin A.S., Zakharova M.V. Protein NCR118: the role of gene fusion in the molecular evolution of restriction endonucleases. // FEBS Lett. 2017; 591(12):1702-1711.
5. Filatova I.Y., Kazakov A.S., Muzafarov E.N., Zakharova M.V. Protein SgpR of *Pseudomonas putida* strain AK5 is a LysR-type regulator of salicylate degradation through gentisate. // FEMS Microbiol Lett. 2017 3;364(12).
6. Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Dovbnya D.V., Bragin E.Y., Donova M.V. Effect of methyl- β -cyclodextrin on gene expression in microbial conversion of phytosterol. // Appl Microbiol Biotechnol. 2017;101(11):4659-4667.
7. Sukhodolskaya G., Fokina V., Shutov A., Nikolayeva V., Savinova T., Grishin Y., Kazantsev A., Lukashev N., Donova M. Bioconversion of 6-(N-methyl-N-phenyl)aminomethyl androstane steroids by *Nocardioides simplex*. // Steroids. 2017;118:9-16.
8. Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Fokina V.V., Pekov Y.A., Ivashina T., Donova M.V. Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. Curr Genet. 2016;62(3):643-56.
9. Morgunov I.G., Karpukhina O.V., Kamzolova S.V., Samoilenko V.A., Inozemtsev A.N. Investigation of the effect of biologically active threo-Ds-isocitric acid on oxidative stress in *Paramecium caudatum*. // Prep Biochem Biotechnol. 2018 2;48(1):1-5.
10. Kamzolova S.V., Morgunov I.G. Metabolic peculiarities of the citric acid overproduction from glucose in yeasts *Yarrowia lipolytica*. // Bioresour Technol. 2017; 243:433-440.
11. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Lunina J.N., Mironov A.A., Stepanova N.N., Shemshura O.N., Vainshtein M.B. Application of organic acids for plant protection against phytopathogens. // Appl Microbiol Biotechnol. 2017;101(3):921-932.
12. Kamzolova S.V., Morgunov I.G. Biosynthesis of pyruvic acid from glucose by *Blastobotrys adenivorans*. // Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(17):7689-97.

13. Kamzolova S.V., Allayarov R.K., Lunina J.N., Morgunov I.G. The effect of oxalic and itaconic acids on threo-Ds-isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica*. // Bioresour Technol. 2016 Apr;206:128-133.
14. Shushkova T.V., Vinokurova N.G., Baskunov B.P., Zelenkova N.F., Sviridov A.V., Ermakova I.T., Leontievsky A.A. Glyphosate acetylation as a specific trait of *Achromobacter* sp. Kg 16 physiology. // Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(2):847-55.
15. Kudryakova I.V., Shishkova N.A., Vasilyeva N.V. Outer membrane vesicles of *Lysobacter* sp. XL1: biogenesis, functions, and applied prospects. // Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(11):4791-801.

ВРИО Директора ИБФМ РА



Леонтьевский А.А.