

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 217.013.01
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ Федерального Государственного Бюджетного
Учреждения «Государственный научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального
исследовательского центра Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский
институт» - ГосНИИГенетика) ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ
УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

о присуждении Дербикову Денису Дмитриевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Аспарат-аммоний-лиазы бактерий: генетическое конструирование штаммов с измененными каталитическими свойствами и их применение в биотехнологии» по специальности 03.02.07 – «Генетика» принята к защите 16 января 2018 г., протокол № 13 диссертационным советом Д 217.013.01, созданным на базе НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика (117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1), утвержденного приказом Минобрнауки РФ № 105/НК от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Дербиков Денис Дмитриевич, 1991 года рождения, в 2012 году окончил Московский Государственный Университет Пищевых Производств (МГУПП). В 2016 году соискатель окончил аспирантуру при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, в настоящее время работает младшим научным сотрудником в Лаборатории молекулярной биотехнологии НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика.

Диссертация выполнена в Лаборатории молекулярной биотехнологии НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор Яненко Александр Степанович, директор НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика.

Официальные оппоненты:

Егоров Сергей Николаевич, доктор биологических наук, доцент, биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, кафедра молекулярной биологии,

Рожкова Александра Михайловна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного учреждения Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН), г. Пущино, в своем **положительном** отзыве, подписанном доктором биологических наук Моргуновым И.Г., заведующим Лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов, указала, что практическая значимость работы состоит в разработке штаммов бактерий, предназначенных для промышленного получения L-аспарагиновой кислоты. В качестве замечаний указывается наличие в работе небрежностей в представлении материала, что несколько затрудняет его восприятие. Недостаточно оправдано создание продуцента L-аспарагиновой кислоты на основе штамма *E. coli*, поскольку эта бактерия принадлежит к IV группе патогенности, что предъявляет повышенные требования в подготовке персонала и утилизации отходов. Недостаточно подробно описано определение величины K_M и не указаны величины V_{\max} и $k_{\text{кат}}$, которые рассчитываются на основании одних и тех же экспериментальных данных. Вместе с тем, указанные замечания не снижают ценности диссертационной работы, не влияют на ее главные работы и носят рекомендательный характер. Также отмечено, что по актуальности, научной новизне, фундаментальной и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученой степени» утвержденного постановлением правительства РФ №842 от

24.09.2013 г. в редакции от 28.08.2017 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Соискатель имеет 2 опубликованные работы, в том числе 2 статьи по теме диссертации, из них 2 в рецензируемых научных изданиях, а также 2 патента.

Список научных работ по теме диссертаций:

1) А.Д. Новиков, **Д.Д. Дербиков**, О.В. Шапошникова, Т.А. Губанова, С.В. Каменева, А.С. Яненко. Высокоэффективная экспрессия гена аспартазы (L-аспартат-аммоний-лиазы) в клетках *Escherichia coli*. Биотехнология, 2014, № 5, С. 19-24.

2) **Д.Д. Дербиков**, А.Д. Новиков, Т.А. Губанова, М.Г. Тарутина, И.Т. Гвилава, Д.М. Бубнов, А.С. Яненко. Синтез аспарагиновой кислоты с использованием в качестве биокатализаторов штаммов *Escherichia coli* с удаленными генами фумараз. Биотехнология, 2016, Т.32, №5, С. 38-48.3)

3) А.Д. Новиков, **Д.Д. Дербиков**, Т.А. Губанова, А.С. Яненко. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, обладающий конститутивной аспартазной активностью и способ синтеза L-аспарагиновой кислоты с использованием этого штамма в качестве биокатализатора. Патент РФ №2546239. Выдан 10.04.2015.

4) **Д.Д. Дербиков**, Т.А. Губанова, А.Д. Новиков, Т.В. Юзбашев, А.С. Яненко. Бесплазмидный рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, обладающий конститутивной аспартазной активностью и способ синтеза L-аспарагиновой кислоты с использованием этого штамма в качестве биокатализатора. Патент РФ №2620942. Выдан 30.05.2017.

Вклад соискателя в проведение исследований является основным и состоит в непосредственном планировании исследований, реализации экспериментальной части, обработке и анализе полученных данных.

На диссертацию и автореферат поступили **положительные** отзывы:

от Волченко Никиты Николаевича, кандидата биологических наук, доцента кафедры генетики, микробиологии и биотехнологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»;

от Гронского Сергея Викторовича, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника ЗАО «НИИ Аджиномото-Генетика». Отзывы критических замечаний не содержат.

От Лобанова Константина Владимировича, кандидата биологических наук, научного сотрудника ИМБ РАН;

от Петенко Александра Ивановича, профессора, доктора сельскохозяйственных наук, заведующего кафедрой биотехнологии, биохимии и биофизики ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина. В отзывах сделаны незначительные замечания, касающиеся неточностей в оформлении.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными интересами и достижениями в области генетики, микробиологии и молекулярной биологии микроорганизмов, позволяющими оценить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Показано, что клетки бактерий, содержащие повышенные количества аспартат-аммоний-лиазы, способны с высокой эффективностью превращать фумаровую кислоту в L-аспарагиновую кислоту.

Предложены подходы для высокоэффективного биотехнологического получения L-аспарагиновой кислоты в промышленных масштабах, основанные на использовании иммобилизованных клеток биокатализатора.

Разработана методика конструирования штаммов– биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты, включающая сверхэкспрессию ферментов аспартаз и делетирование генов ферментов фумараз.

Доказано, что содержание аспарагиновой кислоты в клетках *Corynebacterium glutamicum* (сверх-продуцента лизина), не является лимитирующей стадией при внутриклеточном синтезе лизина.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Доказано, что использование фаговых промоторов P_{G25} и P_{A1} перспективно для повышения экспрессии генов в бактерии *Escherichia coli*.

Раскрыты особенности функционирования различных бактериальных и фаговых промоторов в клетках бактерий *Escherichia coli*.

Изучены физико-химические свойства аспарат-аммоний-лиаз из бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus*, и двух штаммов *Corynebacterium*, и показано, что они различаются по своим характеристикам.

Проведена модернизация модели функционирования цикла трикарбоновых кислот в клетках бактерий *Escherichia coli* при удалении генов ферментов фумараз и предложена гипотеза о способности аспартазы и аспаратаминотрансферазы компенсировать отсутствие активности фумараз.

Значение для практики подтверждается тем, что:

Разработана и внедрена технология получения оптически чистой L-аспарагиновой кислоты с использованием сконструированного в ходе диссертационной работы штамма бактерий *Escherichia coli*.

Определены показатели качества L-аспарагиновой кислоты, полученной с помощью биокаталитической трансформации.

Показано, что стабильность биокатализатора на основе сконструированного штамма *Escherichia coli* практически вдвое превышает этот показатель у биокатализатора предыдущего поколения.

Продемонстрированы перспективы практического использования современных методов редактирования геномов бактерий с помощью фаговых рекомбиназ для создания высокоэффективных биокатализаторов.

Представлены предложения по дальнейшему совершенствованию каталитической активности аспарат-аммоний-лиазы с использованием белковой инженерии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ показана воспроизводимость результатов, полученных на сертифицированном оборудовании;

теоретические положения и выводы, изложенные в диссертационной работе, базируются на полученных автором экспериментальных результатах и анализе современных литературных данных;

идея базируется на анализе практики в области создания биокатализаторов для получения L-аспарагиновой кислоты;

использованы современные методики сбора и обработки исходной информации, что свидетельствует о высоком методическом уровне.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении основной экспериментальной работе, обработке, анализе и обсуждении полученных результатов. Автор также являлся основным участником написания статей по результатам работы.

На заседании 11 апреля 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Дербикову Д.Д. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.02.07 – генетика, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 16, против - нет, недействительный – 1.

Председатель диссертационного совета

д.б.н., профессор, академик РАН

Дебабов В.Г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент

Воюшина Т.Л.

Дата составления заключения

23 марта 2018 г.