

ОТЗЫВ

о диссертационной работе Приворотской Елизаветы
Александровны

«Получение стабилизированных форм гидролитических ферментов технического и фармацевтического назначения», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности: 03.01.06 –Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы диссертации

Стабилизация ферментных препаратов одна из основных задач инженерной энзимологии. В этом отношении диссертационная работа Е.А. Приворотской посвящена актуальной проблеме биотехнологии, а именно изучению методов иммобилизации ферментных препаратов, как медицинского, так и технического назначения. Несмотря на длительные и многочисленные исследования в этой области, в том числе по связыванию белков на текстильных материалах [Филатов В.Н. , Рыльцев В.В, 2002; Белов А.А. 2009], иммобилизации ферментов с использованием природных биополимеров уделяется большое внимание.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов заключается в получении иммобилизованных на природных носителях (целлюлоза, альгинат, хитозан) гидролитических ферментов и в сравнении их основных термодинамических и кинетических параметров с нативными ферментами (трипсин крупного рогатого скота, протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба (ПК), панкреатическая липаза и грибная амилаза). На основании анализа выбраны препараты, обладающие повышенной операционной, конформационной, функциональной стабильностью и более стабильные при хранении, какими являются трипсин, ПК амилаза, иммобилизованные с

использованием хитозана на целлюлозе, а также липаза, микрокапсулированная методом обратного ионотропного гелеобразования с использованием альгината и хитозана.

Научно-практическая значимость полученных результатов состоит в подборе эффективного сочетания хитозана и добавок (смягчающий агент глицерин, способствующие заживлению витамин С и аскорутин) при иммобилизации на текстильных материалах трипсина и ПК с целью создания комплексных перевязочных материалов пролонгированного действия при лечении гнойно-некротических ран. На модельных промышленных субстратах (ячменный солод, жиросодержащие отходы) продемонстрировано преимущество использования иммобилизованных амилазы и липазы по сравнению с нативными ферментами.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений

Научные положения и практические рекомендации, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении достаточного объема экспериментального материала. В работе использованы, соответствующие поставленным задачам, методы ферментативного анализа, ИК-спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии. Научные положения, выводы, рекомендации и заключения, полученные в диссертации, основаны на использовании современных методов математического анализа. Выводы достаточно аргументированы и вытекают из проведенных автором исследований.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста, включает 44 рисунка и 27 таблиц. Она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка использованных

библиографических источников, включающего 246 наименований отечественных и зарубежных работ, приложения с характеристикой колебательных частот соединений при ИК-спектроскопии.

Обзор литературы включает три основные части. Первая часть посвящена свойствам и практическому использованию гидролитических ферментов (протеаз, липаз и амилаз) в промышленности и медицине. Вторая часть рассматривает основные пути повышения стабильности ферментов и различные способы их иммобилизации. В третьей части охарактеризованы основные носители для иммобилизации и уделено особое внимание целлюлозе, диальдегидцеллюлозе, хитозану и альгинату, которые использованы в работе.

Замечания по диссертации

Диссертация Е.А. Приворотской не содержит существенных недостатков, однако имеется ряд замечаний.

1. В обзоре литературы имеются опечатки, в том числе на стр. 29 написано « в обращенные мицеллы аэрозоля в октане...» вместо «в обращенные мицеллы аэрозоля ОТ в октане», который является поверхностно-активным веществом.
2. В разделе «Материалы и методы» отсутствует характеристика целлюлозы, вызывает сомнение характеристика и производитель использованных низкомолекулярных биополимеров хитозана (480 Да) и альгината (10 кДа), недостаточно ясно изложена методика иммобилизации гидролаз микрокапсулированием.
3. Изложение раздела 3.1 «Исследование физико-химических характеристик нативных гидролаз» с характеристикой нативных ферментов отдельно от материала с характеристикой

иммобилизованных ферментных препаратов неудобно при чтении работы.

4. На стр. 65 неудачно сформулирована фраза «...Значение константы Михаэлиса используют для определения концентрации субстрата, необходимой для достижения максимальной скорости реакции...».

5. На стр. 68 из рисунка 3.2 не следует, что температурный оптимум протеаз и липазы лежит при 37 °С, а амилазы при 45 °С.

6. На стр. 76 неудачно использован термин «стабильность при хранении», под которым автор понимает сохранение ферментативной активности препаратов при инкубации в оптимальных условиях среды (рН, температура).

7. В разделе 3.2. «Получение иммобилизованных форм гидролаз» при обсуждении взаимодействия полисахаридов с ферментными препаратами не использованы их важные физико-химические свойства, такие как молекулярная масса и изоэлектрическая точка.

8. На стр. 80-81 не корректно использование названия «иммобилизованные на твердом носителе» ферментные препараты для образцов, полученных при высушивании ферментов в присутствии 5% растворов альгината или хитозана на полиэтиленовой пленке.

9. На стр. 84-85 в таблицах 3.9 и 3.10 отсутствует графа с удельной активностью иммобилизованных ферментов, а расчет этого показателя для трипсина, липаза и амилазы показывает значительное отличие от активностей нативных ферментов, указанных для тех же субстратов в разделе материалы и методы (стр. 54).

10. На стр. 87-88 получение ферментных препаратов микрокапсулированием и их характеристика изложены слишком лаконично. Приведены только данные сканирующей электронной микроскопии микрочастиц с липазой и таблица 3.12. с данными

количества белка, приходящегося на 1 грамм препарата, которые трудно оценить, так как непонятно, сколько препарата было получено и сколько фермента включилось. Не хватает данных с сохранением активности микрокапсулированных ферментов.

11. На стр. 105-106 при обсуждении таблицы 3.14 автор делает вывод «Наибольшее снижение $k_{ин}$ наблюдается при термоинактивации иммобилизованных на хитозан содержащей целлюлозе следующих гидролаз: трипсина (в 2 раза), протеолитического комплекса (в 3,5 раза), амилазы (в 1,8 раз) и микрочастиц липазы (в 3 раза) в сравнении с данными констант скорости инактивации аналогичных экспериментов с нативными формами гидролаз при оптимальных температурах для каждого ферментного препарата». Сравнение этих данных с таблицей 3.2 для нативных ферментов и с эффектом стабилизации при термоинактивации в таблицах 3.16 и 3.22 не подтверждает указанные численные значения.

12. На стр. 116 делается вывод, что энергия Гиббса для препаратов иммобилизованной липазы снизилась, однако сравнение данных таблицы 3.21 с таблицей 3.6 для нативного фермента такой вывод не подтверждает. Аналогичное явление наблюдается и для микрокапсулированной липазы в таблице 3.22 (соответственно в автореферате в таблице 8).

13. На стр. 119 не понятна причина принятия на рис. 3.31 за A_0 активность нативного фермента, а не иммобилизованного.

14. Практическое использование для гидролиза ячменного солода амилазы, иммобилизованной на хитозан содержащем текстильном носителе (раздел 3.9.1), а также для гидролиза отходов мясоперерабатывающей промышленности липазы, микрокапсулированной с использованием дорогих низкомолекулярных альгината и хитозана (раздел 3.9.2), вызывает определенное

сомнения, поэтому можно было бы назвать этот подраздел «модельное использование».

15. В значительном количестве таблиц (3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.16) и рисунков (3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.34, 3.35, 3.36, 3.38, 3.39, 3.41, 3.42) не приведены стандартные отклонения значений количества иммобилизованного белка, ферментативной активности или степени гидролиза субстрата. Отдельные таблицы (3.13, 3.14, 3.15, 3.19, 3.20, 3.21) с характеристикой иммобилизованных препаратов, в которых отсутствуют данные для нативных ферментов, очень тяжелы для восприятия.

16. В выводах неудачно использованы определенные словосочетания. Например, «наиболее эффективные условия», «нативных форм гидролаз», «раневую среду», «новый тип атравматичного перевязочного материала». В выводах 5 и 6 лучше было бы сравнить эффективность процессов гидролиза ячменного солода и жиросодержащих отходов при использовании нативных и иммобилизованных препаратов амилаза и липаза соответственно.

17. В списке литературы следует отметить неоднородность оформления ссылок, дублирование ссылок (№ 20 и № 98), а также наличие опечаток (например, № 198, № 233).

Общая характеристика диссертационной работы

Представленная диссертация Приворотской Е.А. выполнена на достаточно высоком научно-техническом уровне и обладает новизной, теоретической и практической значимостью.

Результаты диссертационной работы, выносимые на защиту, прошли достаточную апробацию на 8 научных конференциях, в том числе с международным участием, опубликованы в 5 печатных работах в журналах, рекомендованных ВАК.

Текст автореферата и печатные работы Приворотской Е.А. отражают содержание диссертации.

Представленная к защите работа по обоснованности суждений, достоверности выводов, теоретической и практической значимости соответствует основным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Выводы, сделанные в диссертации, следуют из изложенных результатов, и соответствуют поставленным в работе задачам. Научная новизна и практическая ценность работы не вызывают сомнений. В целом работа может считаться завершенным научным исследованием.

Полученные автором результаты имеют важное практическое значение. Примененный автором подход с анализом термодинамических и кинетических параметров для анализа операционной, функциональной и конформационной стабильности иммобилизованных и нативных гидролаз может быть применен при поиске новых форм стабилизированных ферментов. Рецензируемая работа соответствует паспорту специальности 03.01.06–Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в части п. 7 «Разработка новых технологических процессов на основе микробиологического синтеза, биотрансформации, биокатализа, иммуносорбции, биодеструкции, биоокисления и создание систем биокомпостирования различных отходов, очистки техногенных отходов (сточных вод, газовых выбросов и др.), создание замкнутых технологических схем микробиологического производства, последние с учетом вопросов по охране окружающей среды.

Таким образом, диссертационная работа Приворотской Е.А. является законченной научно-квалификационной работой и содержит новое решение актуальной научной задачи создания стабилизированных форм ферментов.

Исходя из сказанного выше, считаю, что диссертационная работа «Получение стабилизированных форм гидролитических ферментов технического и фармацевтического назначения» по актуальности темы, объему выполненной работы, новизне полученных данных, важности разработанных теоретических положений, надежности полученных результатов и обоснованности выводов полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., № 842. Автор диссертации Приворотская Елизавета Александровна заслуживает присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Старший научный сотрудник кафедры химической энзимологии
Химического факультета

ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова

к.х.н., доцент

Бал

Балабушевич

Подпись Н.Г. Балабушевич удостоверяю.

07.2018

Ученый секретарь Химического факультета
ФГБОУ ВПО «МГУ имени М.В.Ломоносова»,
к.х.н.

З



Зверева

И.сотрудник,

Балабушевич Надежда Георгиевна, старш
кандидат химических наук, доцент

Адрес места работы: Ленинские горы, д. 1 строение 11, Москва,
Россия, 119991

ФГБОУ ВПО «МГУ имени М.В.Ломоносова»,

Рабочий телефон: +7(495)9393417

e-mail: nbalab2008@gmail.com



Декан Химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова,
академик РАН, профессор, д.х.н.

В.В. Лунин