

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Приворотской Елизаветы Александровны «Получение стабилизированных форм гидролитических ферментов технического и фармацевтического назначения», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.06.01 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

### **Актуальность диссертационной работы**

Диссертационная работа Приворотской Елизаветы Александровны посвящена разработке стабилизированных форм гидролаз и относится, с одной стороны, к области промышленной биотехнологии, а именно инженерной энзимологии, в которой при разработке эффективных биотехнологических процессов применяются иммобилизованные ферменты; с другой стороны, к медицинской биотехнологии, в которой ферменты используются как компоненты при разработке препаратов биомедицинского назначения.

Благодаря развитию современных методов микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии, химии белков и др., разработано множество подходов для улучшения функциональных свойств ферментов. Однако некоторые старые методы получения промышленных биокатализаторов на основе ферментов, такие как иммобилизация, представляются в последнее время как очень мощный инструмент для улучшения почти всех характеристик биокатализаторов (стабильности, активности, специфичности, снижения влияния ингибиторов). Несмотря на то, что термин «иммобилизованные ферменты» начали использовать в 70-х годах, но и в настоящее время продолжают разрабатываться новые подходы и методики иммобилизации ферментов для создания высокоэффективных и стабильных биокатализаторов, новых биомедицинских препаратов, биоаналитических систем и т.д. Во всех этих разработках ключевым фактором является использование специфических носителей и условий для иммобилизации, которые обеспечивают образование такой структуры «фермент-носитель», в которой нативный фермент благодаря специфическим взаимодействиям между функциональными группами белка и носителя фиксируется в определенной, так называемой «открытой» ориентации. Иммобилизованные ферменты незаменимы в медицинской практике для лечения гнойно-некротических процессов различной этиологии. В этом случае для увеличения лечебного эффекта следует совместно с ферментами использовать и другие биологически активные соединения. Как и при разработке промышленных биокатализаторов, для ферментных препаратов медицинского назначения актуальным является вопрос об увеличении сроков их хранения и повышении их стабильности. Однако для создания и практического применения новых биокатализаторов и медицинских препаратов на основе иммобилизованных ферментов необходимо проведение научно-



исследовательских работ по изучению различных аспектов функционирования конкретных систем, разрабатываемых для решения определенных задач.

Таким образом, выбранное диссертантом направление исследований и тема диссертационной работы «Получение стабилизированных форм гидролитических ферментов технического и фармацевтического назначения» актуальны, представляют несомненный практический интерес для промышленной и фармацевтической биотехнологии и важны для развития биотехнологии в России.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертация Е.А. Приворотской построена по классической схеме и состоит из обзора литературных данных; описания материалов и методов исследования; изложения полученных результатов; выводов; списка цитируемой литературы; приложения, в котором приведены характеристичные колебательные частоты ферментов, носителей и иммобилизованных систем. Работа изложена на 170 стр. машинописного текста и содержит 27 таблиц и 44 рисунка. Список литературы содержит 246 наименований, в том числе 98 англоязычных.

Во введении автор обосновывает актуальность проводимых исследований, постановку цели и задач исследования, выделяет научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Диссертант убедительно доказывает необходимость разработки новых стабильных форм ферментных препаратов путем иммобилизации ферментов и ферментных комплексов для их внедрения в практику, что обуславливает инновационный подход развития биотехнологии в нашей стране.

Литературный обзор по теме диссертации Е.А. Приворотская начинает с рассмотрения вопросов практического применения гидролитических ферментов, что еще раз подчеркивает конкретную практическую направленность диссертационной работы. Далее она дает общую характеристику гидролитическим ферментам, подробнее останавливаясь на тех ферментах и ферментных комплексах, которые использует в своей работе. В следующем разделе литературного обзора диссертант характеризует различные виды стабильности ферментов, описывает возможные пути увеличения стабильности с анализом их преимуществ и недостатков и делает вывод о перспективах различных подходов иммобилизации ферментов для их стабилизации. Далее автор описывает различные методы для иммобилизации ферментов, а в последнем разделе приводит характеристику природных полимерных носителей для иммобилизации, которые использует в своей работе. Подробно рассмотрены механизмы взаимодействия белков с различными природными полисахаридами, что важно для этого исследования. В целом информация, приведенная в литературном обзоре, позволяет выбрать



направления исследования по теме диссертации. С моей точки зрения, диссертанту следовало бы подробнее остановиться на анализе различных подходов, используемых для иммобилизации гидролаз, в частности, липаз, которые позволяют получать эффективные и стабильные биокатализаторы, используя для этого более глубокий анализ литературы, в том числе англоязычной литературы по этому направлению. Наряду с анализом оригинальных статей и обзоров, опубликованных в научных журналах, Е.А. Приворотская широко использовала результаты российских ученых, представленные в диссертационных работах (приведены ссылки на 45 диссертаций!). Это свидетельствует о подробном изучении опыта коллег и преемственности научных исследований в работе Приворотской, что замечательно, но с другой стороны, важно уделять больше внимания исследованиям, апробированным в широкой научной среде и опубликованным в высокорейтинговых журналах.

В главе 2 «Материалы и методы» диссертант приводит описание объектов исследования, подробные экспериментальные методики получения иммобилизованных ферментов, их анализа, характеристики и использования. Объектами исследования служили препараты гидролитических ферментов с протеазной, амилазной и липазной активностью: трипсин поджелудочной железы крупного рогатого скота («Спофа», Чехия и «Самсон Мед», Россия); протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба (НПО «Биопрогресс», Россия); амилаза гриба *Aspergillus oryzae* (AB Enzymes GmbH, Германия); липаза поджелудочной железы крупного рогатого скота («Sigma-Aldrich», США). Для иммобилизации ферментов были использованы природные полисахариды – хитозан, альгинат натрия и целлюлоза, которая в работе была химически модифицирована до диальдегидцеллюлозы для более эффективного взаимодействия с хитозаном. Степень окисления целлюлозы определяли химическим методом по количеству образовавшихся альдегидных групп.

Для определения активности нативных и иммобилизованных ферментов в работе диссертант использовал стандартный биохимический подход, основанный на определении скорости образования продукта реакции с использованием фотометрических и титриметрических методов; для содержания белка в препаратах – чувствительный метод Лоури, а для иммобилизованных белков и низкомолекулярных полипептидов – модифицированные методы Лоури.

Для выяснения природы связей между белками-ферментами и полисахаридными матрицами использовали метод ИК-спектроскопии, который позволил выявить в некоторых образцах образование ковалентных связей между объектами исследования.

Методики иммобилизации ферментов, изучения их свойств в зависимости от различных факторов и применения в модельных процессах тщательно



продуманы, подробно описаны и отработаны до мелочей, что характеризует диссертанта как квалифицированного биотехнолога с хорошей химической подготовкой. Микрочастицы, полученные в ходе микроинкапсулирования ферментов в альгинат-хитозановые носители, охарактеризованы современным методом сканирующей электронной микроскопии. Таким образом, использованные в работе методы позволяют решать поставленные в работе задачи.

В главе 3 диссертант представляет полученные в ходе исследования результаты. На основе экспериментальных данных об активности нативных форм ферментов в зависимости от температуры и pH среды автор определяет оптимальные условия функционирования ферментов. Используя фундаментальное уравнение ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен, автор рассчитывает основные кинетические параметры ферментативных реакций при разных температурах, значения которых свидетельствуют об изменении конформации ферментов в зависимости от температуры. В процессе изучения функциональной стабильности нативных форм ферментов диссертант определил константы скорости инактивации ферментов в зависимости от температуры и pH-среды. Значения максимальных скоростей ферментативных реакций при разных температурах автор использовал для определения энергии активации ферментативных реакций. Конформационную стабильность ферментов оценивал на основе расчетов термодинамических характеристик процесса термоинактивации ферментов. Безусловно, получены интересные результаты, которые автор, к сожалению, детально не обсуждает. Кроме того, не ясно, как представлены результаты: с доверительными интервалами или со стандартными отклонениями? В первом случае следует округлять результаты и доверительные интервалы до одной значащей цифры, во втором случае необходимо указывать статистические условия (доверительную вероятность и число определений для расчета стандартного отклонения).

На основе проведенных исследований диссертант делает вывод о низкой стабильности нативных форм исследуемых ферментов и обосновывает создания модифицированных форм ферментных препаратов путем иммобилизации ферментов на природных полисахаридах. Исследование стабильности разных форм иммобилизованных ферментов позволило выявить некоторые закономерности при получении активных и стабильных форм иммобилизованных ферментов. Иммобилизация протеаз и амилазы на носитель целлюлоза-хитозан и липазы в альгинатные микрочастицы приводит к увеличению стабильности относительно нативных форм гидролаз. Важно отметить, что полученные в работе ферментные материалы на текстильных носителях не уступают по своим параметрам коммерчески доступным ферментным материалам, но основаны на использовании природных



полисахаридов, которые сами обладают биологической активностью, что важно для дальнейшего их применения в медицинской практике.

Исследование кинетических параметров иммобилизованных форм ферментов показало, что значения констант Михаэлиса иммобилизованных и нативных форм ферментов практически совпадают, а максимальные скорости ферментативных реакций в случае иммобилизованных форм выше. Это подтверждает предположение о стабилизации конформации активного фермента. Важно, что автор попытался найти некоторые ответы на вопрос о механизмах стабилизации ферментов природными полисахаридами с использованием метода ИК-спектроскопии. На основе подробного анализа ИК-спектров различных образцов и сравнения их с ИК-спектрами исходных соединений при использовании компьютерной программы программы Spectra Suite диссертанту удалось установить, что иммобилизация протеаз и амилаз на полисахаридах приводит к образованию ковалентных связей типа основания Шиффа, в то время как липазы не образуют таких связей при микрокапсулировании в альгинат-хитозановые микрочастицы. Вероятно, это является фундаментальной особенностью липаз – ферментов, которые эффективно функционируют на границе раздела гидрофильной и липофильной фаз. Несмотря на подробный анализ данных по ИК-спектроскопии, у автора не совсем получилось расставить четкие акценты при объяснении полученных им очень интересных результатов. Возможно, они могут служить отправной точкой для дальнейшего выяснения механизмов взаимодействия различных ферментов с природными полисахаридами с подключением других методов исследований.

Значительная часть диссертационной работы посвящена изучению операционной, функциональной стабильности и стабильности при хранении иммобилизованных ферментов. Автором получен значительный объем экспериментальных данных, которые позволили определить эффективные константы скорости инактивации иммобилизованных ферментов под действием температуры и рН-среды и рассчитать величины эффекта стабилизации для иммобилизованных форм ферментов. Значения этого параметра послужили критерием отбора наиболее эффективных сочетаний «фермент-носитель-метод иммобилизации», что можно использовать и в других исследованиях по получению стабильных форм биокатализаторов.

На основе зависимостей скорости ферментативных реакций от температуры и рН-среды диссертант определили ряд кинетических и термодинамических параметров, значения которых свидетельствуют о стабилизации нативной конформации ферментов путем их иммобилизации на природных полисахаридах.

Значимым разделом диссертации Е.А.Приворотской является раздел, касающийся практического использования иммобилизованных ферментов и



разработки рекомендаций для их применения в качестве атравматичного перевязочного материала пролонгированного действия со смягчающим компонентом и витаминами, а также как промышленных биокатализаторов в процессах очистки жиросодержащих стоков и получения солода в пивоварении. Диссертант представил убедительные данные о перспективах практического применения разработанных препаратов на основе иммобилизованных ферментов.

#### **Достоверность и новизна результатов**

Как уже отмечала выше, все методики, представленные в экспериментальной части, являются отточенными, а используемые методы позволяют решить поставленные задачи. Результаты экспериментов обрабатывали статистическим методом анализа, и они являются достоверными и обоснованными.

Среди принципиально новых результатов следует отметить следующие:

- получены кинетические и термодинамические параметры иммобилизованных форм гидролаз, проведено их сравнение с соответствующими параметрами нативных гидролаз;
- установлено, что наиболее высокой каталитической активностью обладают иммобилизованные на хитозансодержащей целлюлозе трипсин, протеолитический комплекс и амилаза, в то время как для липазы более эффективным способом иммобилизации является микрокапсулирование в альгинатный гель.
- иммобилизация протеаз и амилаз на полисахаридах приводит к образованию ковалентных связей с носителем, в то время как липазы не образуют таких связей при микрокапсулировании в альгинат-хитозановые комплексы.

#### **Практическая значимость полученных результатов**

Диссертационная работа Приворотской Е.А. имеет явную практическую направленность. В конечном результате разработан новый вариант комплексного атравматичного раневого покрытия пролонгированного действия. Предложены для практического применения стабилизированные формы липазы и амилазы в процессах очистки жиросодержащих стоков и получения ячменного солода, соответственно. Выявлены технологические аспекты использования этих биокатализаторов.

#### **Публикация основных результатов диссертации и соответствие автореферата положениям диссертации**

Основные результаты изложены в 13 публикациях, в том числе в 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, в виде главы в монографии на английском языке.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают результаты диссертации.



## Недостатки диссертации

Некоторые недостатки диссертации были отмечены мною в ходе общей оценки работы, некоторые будут представлены ниже:

1. Диссертант не всегда четко формулирует свои мысли на русском языке. В качестве примера приведу некоторые выражения:
  - ✓ «Целью работы является разработка стабилизированных форм гидролитических ферментов, способных найти применение в технических и фармацевтических целях, а также оценка их эффективности на основе анализа их кинетических и термодинамических параметров» (найти применение в целях?)
  - ✓ Задачи: «термодинамических параметров нативных гидролитических ферментов» Термодинамические характеристики процесса термоинактивации, но не ферментов.
  - ✓ «Для рассчитанных значений максимальной скорости и константы инактивации нативных гидролаз были определены значения энергии активации» Энергия активации процесса (реакции). В этом выражении непонятно, о каком процессе идет речь!
2. Несмотря на значительный объем кандидатской диссертации, автор не всегда достаточно полно обсуждает полученные результаты, что не позволяет судить об их новизне и оригинальности (см. по тексту отзыва).
3. Некоторая поспешность при оформлении диссертации привела к разному типу оформлению ссылок по тексту диссертации. Во введении диссертант оформляет ссылку в квадратных скобках в виде фамилии и года, а в остальной части диссертации в нумерованном виде.
4. Отдельно следует отметить оформление списка литературы:
  - ✓ Фамилии и имена авторов то полностью, то с инициалами, которые указаны перед фамилией или после....;
  - ✓ в названии публикации встречаются заглавные буквы только в первом слове или все слова начинаются с заглавной буквы,;
  - ✓ No.4, Vol. 52- сначала указывают том (Vol.), а затем номер (No).
5. Несмотря на внушительный список анализируемых источников (246 ссылок), только 8 - на работы, опубликованные за последние 3 года, и 24 ссылки на публикации за последние 5 лет.

Тем не менее, замечания носят частный характер и не уменьшают значимости диссертационной работы.

## Заключение

Диссертация Е.А.Приворотской является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных диссертантом комплексных исследований в области химии и биотехнологии



получил развитие метод стабилизации активных форм ферментов путем их иммобилизации на природных полисахаридах, и разработаны новые методики иммобилизации ферментов для создания стабильных биокатализаторов и медицинских препаратов для наружного применения пролонгированного действия.

По актуальности решаемой проблемы, достоверности научной и практической значимости полученных результатов представленная диссертация «Получение стабилизированных форм гидролитических ферментов технического и фармацевтического назначения» соответствует пункту 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (город Москва), предъявленным к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и пункта 7 паспорта специальности 03.06.01 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), а ее автор Приворотская Елизавета Александровна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по указанной специальности.

Официальный оппонент

Доктор химических наук

по специальности 03.06.01 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии),

доцент, заведующая кафедрой биотехнологии

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»

300012 г.Тула, пр.Ленина, 92.

тел. (раб) +7(4872) 25 79 29

тел. (моб) +7(915) 783 80 13

E-mail: olgaPONAMOREVA@mail.ru

09.01.2018 г

Понаморева Ольга Николаевна



*О.Н. Понаморев*  
*О.Н. Понаморев*  
*09/01/18*