

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Поповой Елизаветы Андреевны на тему: «Получение и свойства протеиназы *Aspergillus ustus*, высокоактивной в отношении фибриллярных белков» по специальностям 03.02.03 – микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

С каждым годом наши представления о роли и свойствах протеолитических ферментов все более углубляются. Исследования протеолитических ферментов в настоящее время приобретают большое значение как в теоретическом, так и в практическом отношении. С одной стороны, хорошо известна роль протеаз в регуляции многих процессов клеточного метаболизма, с другой стороны, в последние годы протеолитические ферменты находят все более широкое практическое применение в самых разнообразных областях промышленности, сельского хозяйства, медицины, в частности, при лечении ожогов, болезней ЖКТ, онкологии, заживлении ран, регулировании процессов свертывания крови, поддержании гигиены полости рта. Описано их применение для получения сывороток и вакцин, лечения воспалительных процессов. Ранозаживляющие повязки, используемые для быстрого и эффективного лечения пролежней, трофических язв, гнойно-некротических ран, обладают протеолитической, эластолитической и коллагенолитической активностями, которые очищают рану от некрозов и нагноений, стимулируют процессы регенерации, препятствуют формированию рубца. Пептидазы с фибринолитической активностью используются в составе препаратов для удаления некротизированных тканей, гнойных выделений и кровяных сгустков в открытых ранах, а также весьма перспективны для использования в медицине в качестве тромболитических препаратов. Вместе с тем необходимость постоянного совершенствования методов лечения ран и патологических рубцов, развитие фармацевтической и косметической отраслей промышленности требуют разработки и внедрения новых эффективных препаратов, содержащих контролируемый набор нескольких ферментов и обладающих высокой конкурентоспособностью на рынке. Поиск новых эффективных пептидаз, изучение особенностей их структуры и функционирования становятся особенно актуальным в связи с их биологической ролью и коммерческим использованием.

Микромицеты обладают огромным биотехнологическим потенциалом, продуцируя гидролазы широкой субстратной специфичности с важными характеристиками, такими как температурная и рН стабильности. Поиск среди микромицетов новых, эффективных продуцентов пептидаз направленного действия, а также изучение физиологии их образования представляется актуальной задачей как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. В связи с этим представленная диссертация Е.А.Поповой, направленная на исследование способности микромицетов секретировать внеклеточные пептидазы, высокоактивные по отношению к фибриллярным белкам, актуальна и представляет явный практический интерес.

Диссертация построена по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей в себя разделы «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», и списка цитированной литературы.

Обзор литературы обобщает довольно большое количество информации, имеющейся по теме диссертационной работы, и дает представление о современном состоянии проблемы. Обзор условно можно разделить на две части - научную и практическую. В первой рассмотрены особенности структуры фибриллярных белков (коллагена, фибрина и эластина), как потенциальных субстратов искомых пептидаз, а также современные представления о протеолитических ферментах, их классификация, имеющиеся данные о коллагенолитических, фибринолитических и эластинолитических пептидазах микроорганизмов и использовании микромицетов в качестве продуцентов искомых протеолитических ферментов. Вторая часть литературного обзора посвящена возможности получения пептидаз, высокоактивных по отношению к фибриллярным белкам, с помощью процесса твердофазного культивирования, рассмотрены принципиальные аспекты этого процесса, молекулярно-физиологические особенности роста микромицетов в этих условиях и биохимические особенности получаемых при этом продуктов. Литературный материал изложен ясно и доступно, с достаточным количеством необходимых деталей и демонстрирует компетентность автора в данной области.

К некоторым недостаткам обзора я бы отнес неточности или ошибки в формулировках, в частности, тройная спираль коллагена из трех полипептидных цепей – это четвертичная структура, а не третичная; коннекторы в молекуле фибриногена образованы тремя  $\alpha$ -спиральными участками, а не тремя  $\alpha$ -спиралями; триада аминокислот не образует каталитический домен, а находится в каталитическом домене. Дискуссионно утверждение, что большое количество секретируемых пептидаз выгодно отличает микромицеты от бактерий. В смысле

разнообразия – это так, но чаще всего нужны индивидуальные ферменты, а их из смеси трудней очищать. С точностью наоборот должна быть трактовка данных таблицы 3, чем выше  $K_m$ , тем ниже сродство к субстрату, а не наоборот. Что еще хотелось бы видеть в обзоре - это анализ не только преимуществ твердофазного культивирования, но и обсуждение возможных недостатков этого метода (сложности с перемешиванием, сложности с контролем температуры, изменение физико-химических свойств получаемых продуктов, причем не всегда в лучшую сторону). Имело бы смысл дать описание объекта исследований, какие есть данные о его распространении, экологии, физиологии и биохимии.

В разделе «Материалы и методы» представлен спектр микробиологических и биохимических методов, использование которых полностью соответствовало поставленным автором экспериментальным задачам. Раздел написан основательно и подробно. Хороший методический уровень и умелое владение автором описанными методами явилось залогом успешного выполнения работы. Несколько замечаний по этой части: у хромогенных субстратов рНА находится на С-конце, а не на N-конце, интересная ошибка в табл. 4, где ингибитор металлопептидаз о-фенантролин превратился в о-фенотропин. Автору следует обратить внимание на явно неполное изложение методики определения рН стабильности, пропущена важная часть – необходимость перед измерением активности доведения всех опытных проб до одинакового рН после длительной инкубации при разных рН.

К наиболее существенным результатам диссертационной работы можно отнести следующие. Найден новый перспективный продуцент пептидаз, обладающих фибринолитической, коллагенолитической и эластинолитической активностью, и подобраны оптимальные условия его культивирования. Показаны преимущества твердофазного культивирования с использованием вермикулита в качестве носителя по сравнению с глубинным культивированием. Выделен наиболее активный по отношению к фибриллярным белкам фермент, образуемый микромицетом *A. ustus* 1, который является негликозилированной сериновой нейтральной пептидазой с широкой субстратной специфичностью, и определены некоторые его физико-химические свойства. По коллагенолитической активности пептидаза, образуемая найденным продуцентом, показала себя конкурентноспособной по сравнению с известными коммерческими препаратами.

Проведенное диссертантом обсуждение результатов сделано умело и логично. Е.А.Попова продемонстрировала в этом разделе умение использовать литературные данные для обоснования определенной интерпретации своих

экспериментальных результатов. Однако к этому разделу есть ряд вопросов и замечаний, требующих разъяснений автора.

1. Почему азотной метаболитной репрессии не наблюдается на среде №1 с присутствием неорганического азота, которая отобрана автором как оптимальная?
2. Почему отсутствуют данные по эластинолитической активности при подборе условий глубинного культивирования? Она там должна быть соизмеримой с коллагенолитической (по данным изоэлектрофокусирования).
3. Можно ли переносить результаты (по влиянию pH, температуры), которые оказались оптимальны при глубинном культивировании на твердофазное культивирование?
4. По результатам определения субстратной специфичности фермента (рис. 35) можно говорить только об узкой специфичности, а не о широкой. Наблюдается явная специфичность по основным аминокислотам, Gly здесь совсем ни при чем. Можно только обсуждать зависимость субстратной специфичности от длины используемого субстрата и от аминокислот в позициях  $R_2$ ,  $R_3$ . Для полной картины субстратной специфичности желательно расширить круг хромогенных субстратов, используя синтетические субстраты, характерные для коллагена.

Следует заметить, что часть указанных замечаний дискуссионна, другие носят непринципиальный характер и не меняют общей положительной оценки работы. В целом экспериментальный материал, полученный в настоящей работе, и сделанные на его основе выводы представляют заметный интерес и являются заметным шагом к получению пептидаз с нужными свойствами. Подводя итог рассмотрению диссертации Е.А.Поповой, хотелось бы отметить, что эта работа является законченным научным исследованием и выполнена на высоком научно-методическом уровне. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, а сделанные на их основе выводы обоснованы. Основные результаты работы Е.А.Поповой адекватно отражены в опубликованных печатных трудах. Автореферат диссертации полностью передает основное содержание диссертационной работы.

Таким образом, по объему полученного материала, достоверности и оригинальности полученных результатов и выводов, а также научной и практической значимости диссертационная работа Е.А.Поповой отвечает требованиям установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации

соответствует паспорту специальностей 03.02.03 – микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) по биологическим наукам и критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Ее автор, Попова Елизавета Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник Отдела белков растений Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», д.б.н., профессор

Дунаевский Яков Ефимович

30.03.2020 г.

Контактные данные: тел.: , e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова