

## Отзыв

официального оппонента Ревина Виктора Васильевича на диссертацию  
Макаровой Екатерины Леонидовны «Закономерности адсорбционной иммо-  
билизации глюкоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.02-Биофизика

Диссертационная работа Макаровой Е.Л. посвящена одной из важней-  
ших проблем биофизики – изучению механизмов взаимодействия ферментов  
с различными соединениями на молекулярном уровне.

Целью данной работы явилось изучение структурно-функциональных,  
физико-химических и кинетических свойств глюкоамилазы, иммобилизован-  
ной на биополимерах и углеродных нанотрубках, исследование закономерно-  
стей гидролиза полисахаридов свободной и иммобилизованной глюкоамила-  
зой.

Современные биофизические методы и приемы позволяют создавать  
ферментные препараты пролонгированного действия на основе различных  
носителей, а также изучать закономерности адсорбционной иммобилизации  
при создании подобных препаратов. Адсорбционный метод иммобилизации  
отличается не только простотой, но и может быть одновременно способом  
моделирования ассоциации-диссоциации важнейших биоструктур клетки.

Актуальность темы представленного исследования определяется недо-  
статочной изученностью такой важной проблемы биофизики как расшифров-  
ка структуры ферментов, изучение молекулярных механизмов действия гид-  
ролаз, моделирование процессов катализа.

Данная работа имеет практическую значимость, так как в качестве но-  
сителей для иммобилизации глюкоамилазы были использованы отходы сель-  
скохозяйственного производства, а полученные ферментные препараты от-

крывают широкие возможности для создания биомедицинских и биосенсорных технологий.

Представленная диссертация представлена в традиционном стиле и состоит из «Введения», 7 глав, «Заключения», «Выводов» и «Приложения». Список литературы содержит 234 источника. Иллюстрационный материал включает 37 рисунков и 11 таблиц в основном тексте и 19 рисунков в «Приложении».

В «Обзоре литературы» подробно представлены современные представления о структуре и физико-химических свойствах амилолитических ферментов, рассмотрено их применение в промышленности и медицине, а также методы и носители для иммобилизации энзимов.

Сведения об используемых материалах и методах изложены в главе 2. В ней перечислены используемые в работе объекты. Приведены методики адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы, подготовки носителей к процессу иммобилизации. Изложена методология измерения активности глюкоамилазы. Также описаны такие современные методы биофизических исследований как атомно-силовая микроскопия на сканирующем зондовом микроскопе SOLVER P47PRO, инфракрасная спектроскопия с использованием ИК-спектрофотометров SPECORD M-80 и Vertex-70, а также компьютерные программы Maestro 9.6, Mole 2.0 и Protein-Protein Docking программа GRAMM-X.

В 3 главе представлены эксперименты по создания гетерогенного катализатора на основе глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене. В этой главе обсуждаются данные по исследованию физико-химических и каталитических свойств полученного ферментного препарата. Установлено, что активность гетерогенного катализатора составляет 66, 25% от активности нативного энзима и его каталитические свойства изменяются, оптимальная температура реакции гидролиза крахмала сдвигается в сторону увеличения температуры на 5 °C. При этом получены графические зависимости каталитической активности глюкоамилазы от концентрации субстрата, pH

среды и температуры, которые могут быть использованы в процессе получения глюкозы.

Одной из экспериментальных задач в главе 4 было исследование процесса термоинактивации. Исходя из экспериментальных данных, полученных Макаровой Е.Л., процесс термоинактивации соответствует концепции разрушения «конформационного замка», то есть тех межсубъединичных контактов, разрушение которых создает возможность диссоциации белкового димера на более лабильные субъединицы.

В главе 5 показано, что пищевые волокна, побочные продукты сахароррафинадного производства, могут быть использованы в качестве носителей глюкоамилазы. При этом данный носитель (среди исследованных природных биополимеров) способствует максимальному сохранению активности при адсорбционной иммобилизации (86%).

Данные, описанные в главе 6, вносят существенный вклад в понимание процесса адсорбционной иммобилизации энзимов на биологических материалах. Кроме того компьютерное моделирование (Maestro 9.6, Mole 2.0) позволило изучить сложную внутреннюю структуру гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы (10 туннелей, 9 полостей, 5 пор).

Особую значимость для изучения процессов взаимодействия ферментов с различными соединениями на молекулярном уровне имеет применение Protein-Protein Docking программы (GRAMM-X), позволяющая определить возможные места контактов, возникающих между ферментом и носителем, и вычислить длины связей, образовавшихся при контакте между группами глюкоамилазы и коллагена.

Приведенные в 7 главе исследования свидетельствуют о том, что адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на нанотрубках позволяет модифицировать свойства глюкоамилазы и направленно изменять их.

В целом, соискателем была проведена большая работа, результаты которой интересны как для фундаментальных аспектов биофизики, так и для прикладных аспектов.

Однако работа не лишена недостатков:

1. Концепция «конформационного замка» в соответствии с экспериментальными данными обсуждается недостаточно.
2. В работе Макаровой Е.Л. упомянут современный метод определения размеров молекул глюкоамилазы с использованием динамического светорассеивания. Однако данные этих экспериментов не приведены автором. Так на с.125 приведено, что «Сравнение размеров аппроксимирующих сфер отдельных частиц в растворах и иммобилизованной глюкоамилазы на модульном спектрометре динамического и статического рассеяния света Photocor Complex, позволяют заключить, что большая часть молекул глюкоамилазы агрегирует друг с другом с образованием более крупных агрегатов глюкоамилазы УНТ», однако, из каких данных следует такой вывод не понятно.
3. В объектах и методах отсутствует описание компьютерных программ, в то же время в работе им уделяется достаточно большое внимание (например, раздел 6.3).
4. В главе 6 не достаточно обсуждены собственные эксперименты по исследованию механизмов взаимодействия молекул глюкоамилазы с коллагеном и углеводными носителями.
5. В списке использованных источников из 234 источников 145 выпущены ранее, чем 2004 г. Особенно смущает использование в списке автором источников 1965, 1967, 1975 и т.д. года выпуска – с тех пор вышли у этих же авторов или других более современные публикации.

Таким образом, диссертационная работа Макаровой Екатерины Леонидовны «Закономерности адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках» полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемых к кандидатским диссертациям. Автор диссертации Ма-

карова Екатерина Леонидовна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Доктор биологических наук,  
профессор, заведующий кафедрой  
биотехнологии, биоинженерии  
и биохимии



Ревин Виктор Васильевич

10.12.2014 г.

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
«Мордовский государственный  
университет им. Н.П.Огарёва»  
430005, г. Саранск, ул. Большевистская, д. 68  
E-mail: [revinvv2010@yandex.ru](mailto:revinvv2010@yandex.ru)  
(8342)324554

