

Отзыв

официального оппонента Шуваевой Галины Павловны на диссертацию Макаровой Екатерины Леонидовны «Закономерности адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика

На отзыв представлены:

- рукопись диссертации на 173 страницах машинописного текста;
- автореферат (на правах рукописи) -24 страницы

Анализ представленных материалов, а также публикаций по теме диссертации позволяет сделать следующее заключение.

Актуальность работы. Исследованию механизма действия амилолитических ферментов, осуществляющих гидролиз гликозидных связей в природных биополимерах, посвящены работы многих отечественных и зарубежных учёных. Однако проблема остаётся актуальной, так как раскрытие механизмов их катализического действия открывает перспективу создания теоретической базы ферментации возобновляемого природного сырья и получения ферментативных лекарственных препаратов пролонгированного действия. В диссертационной работе Макаровой Е.Л рассматриваются важные вопросы, вносящие существенный вклад в решение актуальной проблемы молекулярных основ процесса адсорбционной иммобилизации ферментов, в частности, амилаз на различных носителях.

Автором четко сформулирована цель исследований, направленная на изучение свойств глюкоамилазы, иммобилизованной на биополимерах и углеродных нанотрубках, и исследование закономерностей гидролиза полисахаридов свободной и иммобилизованной глюкоамилазой. Для достижения поставленной цели ею успешно решён ряд задач, включающий разработку

метода адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы; исследование кинетики реакции гидролиза крахмала и механизмов фото- и термоинактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы; изучение закономерностей взаимодействия молекулы фермента с матрицами носителей.

Диссертационная работа содержит хороший литературный обзор, освещающий многие дискуссионные проблемы, связанные с представлениями о структуре и физико-химических свойствах амилолитических ферментов. Автором достаточно глубоко и всесторонне проанализирован отечественный и зарубежный опыт о целесообразности применения амилаз в различных отраслях промышленности и медицине. Значительное место в литературном обзоре уделяется рассмотрению наиболее эффективных методов иммобилизации, их практическому применению, при этом обсуждаются современные представления о носителях, используемых при сорбции биологически активных веществ. В целом представленный обзор литературы говорит об умении автора работать с литературными источниками, сопоставлять и анализировать имеющуюся информацию по тематике исследования, показывает на необходимость проведения исследований в выбранном направлении. На основании критического анализа существующих литературных данных по рассматриваемому вопросу в работе четко сформулированы цель и задачи исследования, разработана схема экспериментов для выполнения главной задачи диссертационной работы.

При выполнении эксперимента автор использовал **современные методы**, применяемые в биофизике: атомно-силовую микроскопию на сканирующем зондовом микроскопе SOLVER P47PRO, инфракрасную спектроскопию с использованием ИК-спектрофотометров SPECORD M-80 и Vertex-70, а также компьютерные программы Maestro 9.6, Mole 2.0 и Protein-Protein Docking программу GRAMM-X.

Результаты исследований и их обсуждения представлены в главах 3-7.

В главе 3 отражены результаты экспериментов по исследованию условий адсорбционного связывания глюкоамилазы на коллагене и подготовке

носителя к иммобилизации. Автором выявлены оптимальные режимы взаимодействия молекулы фермента с носителем, исследованы физико-химические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, установлены оптимальные условия функционирования иммобилизованных ферментных препаратов.

Большое внимание в диссертационной работе уделяется исследованию процесса термической инактивации фермента, иммобилизованного на коллагене (глава 4). Автором представлены расчетные параметры процесса термической инактивации гетерогенного катализатора и нативного энзима ($K_{\text{эфф.}}$, $K_{\text{дисс.}}$ и $K_{\text{ден}}$) и предложена гипотеза «конформационного замка», позволяющая оценить роль четвертичной структуры в сложных процессах денатурации белков.

Макаровой Е.Л. выявлены особенности адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы не только на белках (коллагене), но и на природных полисахаридах: альгинате натрия и пищевых волокнах (глава 5). Автором получены интересные данные, что наиболее высокой каталитической активностью обладает глюкоамилаза, иммобилизованная на углеродных нанотрубках, в то время как фермент, иммобилизованный на природных биополимерах, снижает каталитическую активность (главы 6-7). Показано, что глюкоамилаза, иммобилизованная на пищевых волокнах, полученных из отходов сельскохозяйственного производства, обладает максимальным процентом сохранения каталитической активности нативного энзима (86%).

Исследования и эксперименты поставлены автором методически верно, продуманы, выполнены в строгой логической последовательности и соподчиненности. Методическая подготовленность автора позволила выполнить экспериментальную часть на должном уровне.

Научная новизна. В диссертационной работе представлены новые интересные результаты, впервые полученные путём комплексного исследования адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы с применением классических биофизических методов и компьютерных программ (Maestro 9.6, Mole-

2.0, GRAMM-X). Показано, что в структуре гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы, кроме полости активного центра, имеются и другие особенности укладки третичной организации белковой молекулы (туннели и поры), а также кластеры молекулы воды.

Особое внимание диссертантомделено исследованию основных закономерностей иммобилизации биологически активных веществ на различных носителях, раскрывающих механизмы регулирования каталитической активности мембранны-связанных ферментов *in vivo*.

Используя компьютерные программы (Maestro 9.6, Mole 2.0, Gramm-X), диссертант показал, что при адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене, между носителем и ферментом возникают гидрофобные взаимодействия, предположительно образуются «слабые и сильные» водородные и одиночные ионные связи.

Научные положения настоящей работы расширяют и углубляют современные представления о молекулярных механизмах ферментативного гидролиза полисахаридов, позволяют определить типы взаимодействия между энзимом и матрицами биополимеров и нанотрубок при адсорбционной иммобилизации. Разработанная автором схема адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на природных носителях отражает основные этапы процесса иммобилизации.

Следует отметить, что автор собрала большой экспериментальный материал, логически осмыслила и изложила его в чёткой и ясной форме, проиллюстрировав достаточным количеством рисунков и таблиц. Ею использованы разносторонние подходы к исследованию, применены современные методы, совершенные приборы с высокой разрешающей способностью.

Выводы, сделанные автором, логически следуют из экспериментально полученных данных, отражают основное содержание диссертационной работы. Результаты экспериментов достоверны.

Диссертационная работа не лишена некоторых недостатков, которые, однако, не снижают достоинств работы. Наиболее существенные из них сводятся к следующим:

1. В списке использованных источников значительная их часть представлена работами, изданными до 2000 года.
2. Автором не указан штамм *Aspergillus awamori* – продуцент глюкоамилазы, служившей объектом исследования, не приведена степень очистки энзима, что имеет значение при исследовании механизмов каталитического действия ферментов.
3. Анализируя связи, возникающие при адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене, между носителем и ферментом, автор указывает на «слабые и сильные водородные» связи, что требует уточнения.
4. Изучая термостабильность глюкоамилазы, логично было бы представить данные о термостабильности фермента, иммобилизованного на углеродных нанотрубках.

Диссертационная работа Макаровой Екатерины Леонидовны «Закономерности адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках» представляет собой **завершенный научный труд**, вносящий равный вклад в решение как научных, так и практических аспектов молекулярных основ процесса адсорбционной иммобилизации амилаз на различных носителях.

Основные положения диссертации достаточно полно опубликованы в открытой печати, подтверждают результаты исследований.

Содержание автореферата соответствует основным положениям работы, выводы идентичны.

Считаю, что 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,

предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Макарова Екатерина Леонидовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Кандидат биологических наук, доцент кафедры

биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВПО

«Воронежский государственный университет

инженерных технологий», доцент

Шубаева Галина Павловна

394036, г.Воронеж, пр. Революции,19

+7 (473) 255-55-57

gpshuv@mail.ru

24. 12. 2014 г.

