

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского»



доктор физ-мат. наук, профессор
С.Н. Гурбатов

«24» декабря 2014 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

ФГАОУ ВО "Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского" на диссертационную работу Макаровой Екатерины Леонидовны «Закономерности адсорбционной иммобилизации глокоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02-Биофизика

Актуальность темы

Диссертационная работа Макаровой Е.Л. посвящена актуальной теме – изучение структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств глокоамилазы, иммобилизованной на биополимерах и углеродных нанотрубках, исследование закономерностей гидролиза полисахаридов свободной и иммобилизованной глокоамилазой.

Амилазы регулируют метаболические пути в ответ на изменения pH среды клетки или сигналы других клеток, обеспечивают структурно-функциональную интеграцию компонентов и поддержание клеточного гомеостаза. Адсорбционная иммобилизация переводит фермент из числа гомогенных растворимых катализаторов в гетерогенные, что позволяет повысить стабильность биокатализатора при влиянии денатурирующих факторов среды.

Основные закономерности адсорбционной иммобилизации амилаз на различных носителях, определение типов взаимодействия между энзимом и матрицами биополимеров при адсорбционной иммобилизации до сих пор являются малоизученными проблемами молекулярной биофизики.

В связи с выше изложенным, исследования закономерностей физических методов иммобилизации ферментов являются особенно актуальными.

Новизна исследования, полученных результатов и выводов

Диссертантом с помощью современных методов биофизических исследований: атомно-силовая микроскопия на сканирующем зондовом микроскопе SOLVER P47PRO, инфракрасной спектроскопии с использованием ИК-спектрофотометров SPECORD M-80 и Vertex-70, а также компьютерных программ Maestro 9.6, Mole 2.0 и Protein-Protein Docking программы GRAMM-X проведена работа, посвященная изучению основных закономерностей адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках. Результаты экспериментов получены в многократных повторностях, статистически обработаны.

С помощью программ (Maestro 9.6, Mole 2.0, GRAMM-X) описаны детали третичной структуры глюкоамилазы. Показано, что в состав гидрофобного ядра входят 5 пор, 9 полостей, 10 туннелей. Изучены механизмы образования комплекса глюкоамилаза – носитель при адсорбционной иммобилизации. Рассчитаны длины связей, образующихся между глюкоамилазой и коллагеном.

Разработана методика получения гетерогенных биокатализаторов на основе глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*, иммобилизованной на коллагене, альгинате натрия, пищевых волокнах, а также углеродных нанотрубках. Установлено, что наиболее высокой катализической активностью обладает глюкоамилаза, иммобилизованная на углеродных нанотрубках (153 %). Иммобилизация на природных биополимерах приводит к снижению катализической активности фермента. Выявлены оптимальные условия функционирования иммобилизованных ферментных препаратов. Исследованы закономерности фото- и термоинактивации свободного и иммобилизованного биокатализатора в интервале температур 50-70 °C, рассчитаны константы термоинактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы, изучен процесс термической инактивации глюкоамилазы, который соответствует требованиям теории диссоциативной инактивации.

Таким образом, научная новизна проведенных автором исследований не вызывает сомнения.

Обоснованность выводов, сделанных автором, определена детальным научным анализом полученных экспериментальных данных. Сделанные выводы являются

ются логическим отражением тех новых фактов и закономерностей, которые получены при выполнении работы.

Анализ содержания диссертации.

Диссертационная работа Макаровой Е.Л. изложена на 173 страницах машинописного текста; состоит из «Введения», 7 глав, «Заключения», «Выводов» и «Приложения». Список литературы представлен 234 наименованиями работ отечественных и зарубежных авторов. Иллюстрационный материал включает 37 рисунков и 11 таблиц в основном тексте и 19 рисунков в «Приложении».

В обзоре литературы автор освещает основные представления о структуре и физико-химических свойствах амилолитических ферментов, применение амилолитических ферментов в различных промышленных производствах и медицине. Диссертант подробно раскрывает эту тему. Особое внимание соискатель уделяет методам и носителям иммобилизации амилолитических ферментов. Однако, автор не приводит достаточно сведений об особенностях структуры глюкоамилазы, исследуемой в работе, локализации фермента, механизмах регуляции его активности. Подавляющее большинство цитированной в обзоре литературы относятся к работам 70 - 80-х годов двадцатого века. Учитывая высокую скорость накопления новых данных в активно развивающихся направлениях исследований, хотелось бы видеть большее количество источников за последние годы.

Глава 2 посвящена описанию объекта и методов исследования. В работе использован широкий спектр современных методов, адекватных поставленным задачам. В целом, методы описаны достаточно подробно, в тоже время имеются некоторые неточности, в частности не указан состав буферов, ошибочно указано, что оптическая плотность растворов определялась на спектрофлуориметре Shimadzu RF 5301 PC, а не на каком-либо спектрофотометре.

Результаты экспериментальных исследований в диссертации Макаровой Екатерины Леонидовны представлены в главах 3-7.

Диссидентом разработаны гетерогенные препараты на основе глюкоамилазы. Исследованы условия адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене. В этой же части работы представлены результаты по исследованию физико-химических свойств и кинетических свойств глюкоамилазы, иммобилизованной на

коллагене, а также воздействие УФ-излучения на физико-химические свойства иммобилизованного фермента. Не ясно, почему автор говорит о несоответствии найденной зависимости уравнению Михаэлиса-Ментен, и в то же время рассчитывает значения K_m на основании данного уравнения.

Глава 4 посвящена исследованию закономерностей процесса термической инактивации глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене. С этой целью Макарова Е.Л. проводит эксперименты по термоинактивации свободной и иммобилизованной на коллагене глюкоамилазы до 70 °C, в результате делает вывод о соответствии процесса термоинактивации теории диссociативной инактивации, характерной для четвертичной структуры энзимов.

Главы 5-7 посвящены разработке гетерогенных препаратов глюкоамилазы на углеводных полимерах и нанотрубках. Диссертант также рассматривает физико-химические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на углеводных полимерах и нанотрубках.

Результаты экспериментов Макаровой Е.Л. по иммобилизации глюкоамилазы на альгинате натрия, пищевых волокнах, а также углеродных нанотрубках позволили диссертанту сделать заключение о том, что глюкоамилаза сохраняет наибольшую катализическую активность при адсорбционной иммобилизации на углеродных нанотрубках (153 %) и пищевых волокнах (86 %).

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.

Эксперименты, проведенные Макаровой Е.Л., позволили разработать принципиальную схему адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на природных носителях.

Содержание автореферата и сделанных по работе публикаций полностью отражают основные положения диссертации. Заключение и выводы диссертационной работы соответствуют цели и задачам проводившихся исследований, конкретны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений. Работа хорошо апробирована на нескольких конференциях.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Исследованы основные закономерности иммобилизации биологически активных веществ на различных носителях, способствующие выявлению механизмов регулирования каталитической активности мембраннысвязанных ферментов *in vivo* и созданию гетерогенных препаратов пролонгированного действия.

Разработаны методы адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках. Полученные препараты обладают пролонгированным эффектом.

Показана принципиальная возможность использования отходов сельскохозяйственного производства в качестве носителей для иммобилизации глюкоамилазы, что способствует сокращению экономических затрат при создании гетерогенных препаратов на основе глюкоамилазы.

Вопросы и замечания

1. На рисунках 8 и 10 наблюдается излом в зависимости логарифма относительной активности фермента от времени, который интерпретируется диссертантом, как свидетельство в пользу применимости теории диссоциативной инактивации. Вопрос рассмотрен недостаточно подробно, в частности неясно, какая модель используется в данной теории? В связи с чем возникает излом на полулогарифмической кривой? Имеются ли еще какие-то еще свидетельства в пользу применимости именно этой теории?

2. В таблице 4 отмечается, что $K_{дисс}$ (моль/л) и $K_{\phi\phi}$ (s^{-1}) определяли на основании тангенсов угла наклона начального участка и второго участка на кривой термоинактивации. Каким образом две различных по своей размерности константы были получены из одной величины (тангенс угла наклона)? Если какая-то из них определялась не непосредственно, как тангенс угла наклона, а рассчитывалась на основе его, то необходимо привести расчет. Что автор понимает под константой денатурации?

3. На основании чего был предложен метод расчета n , в частности неясно - как выводится формула для расчета n , какое физическое значение имеет δ , откуда были взяты значения констант 0.13 и 0.05? Более того, используя метод определения δ , описанные диссертантом, остается неясным, что именно принимали за точку излома и, особенно, каким образом проводили к ней касательную в условиях достаточно большого временного шага?
4. Одним из важных результатов является моделирование взаимодействия глюкоамилазы и коллагена. Однако некоторые моменты неясны. Так отмечается, что использованные программы позволяют описать 10 способов взаимодействия фермента и коллагена. Что понимается под "способами" - механизм взаимодействия между молекулами, сайты связывания коллагена или что-то иное? Связывание фермента с коллагеном на участке, около входа в полость активного центра глюкоамилазы, что детально обсуждается диссертантом, является обязательным при связывании коллагена? Или это лишь один из возможных сценариев? Наконец, результаты моделирования могут в существенной степени зависеть от параметров среды (например, pH и ионная сила раствора могут влиять на заряд аминокислот, а значит - влиять на укладку фермента). Учитывалось ли это при моделировании? Имитировались ли условия экспериментов?
5. В работе присутствуют небрежности в оформлении, опечатки, не достаточно хорошо оформленные рисунки и подписи к ним.

Заключение

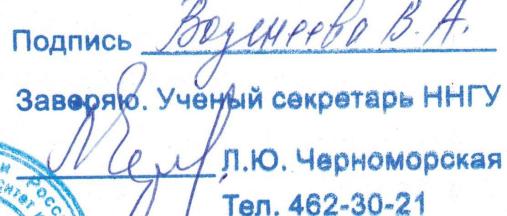
Приведенные выше замечания и пожелания не снижают в целом высокой оценки рецензируемой работы. Диссертация Макаровой Е.Л. «Закономерности адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках» является законченной научно-исследовательской работой, в которой изучены механизмы взаимодействия глюкоамилазы с носителями, разработаны гетерогенные препараты на основе глюкоамилазы при адсорбционной иммобилизации.

Работа соответствует требованиям п. 9. «Положения ВАК РФ», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а сам соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Отзыв обсужден и единогласно утвержден на заседании кафедры биофизики Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского 24 декабря 2014 г., протокол № 7.



Воденеев В.А.



Воденеев Владимир Анатольевич
доктор биологических наук
заведующий кафедрой биофизики
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского

603950, г. Нижний Новгород,
пр. Гагарина, 23

v.vodeneev@mail.ru
+7(831)462-32-15