

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Ефременко Елены Николаевны на диссертационную работу Холявка Марины Геннадьевны «Исследование физико-химических, структурно-функциональных свойств инулиназ и закономерностей формирования ими надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика»

Диссертационная работа Холявка Марины Геннадьевны направлена на всестороннее изучение характеристик (структурных, физико-химических, биокаталитических) различных инулиназ в свободной и иммобилизованной на различных носителях форме. Используя современные методы компьютерного моделирования, а именно молекулярного докинга, в данной диссертационной работе проведен скрининг лигандов, которые наиболее эффективно могут использоваться для сорбционной иммобилизации инулиназы, проведен многосторонний анализ взаимодействий фермента с различными потенциальными носителями и в результате показана возможность сохранения при иммобилизации до 80 % исходной каталитической активности фермента.

Следует отметить, что за последние 5 лет наблюдается рост значительного интереса к иммобилизованным формам разных инулиназ, которые можно применять в проточных реакторных системах для получения фруктозных и фруктозно-глюкозных сиропов в значительных масштабах. Это подтверждают и ссылки самого автора в тексте диссертации. В этой связи, **актуальность** исследования механизма действия и свойств инулиназ, обобщения информации по характеристикам данного фермента, взятого из разных источников, в отношении инулина, выделенного из разных растений, и их изменении в зависимости от условий проведения каталитических реакций не вызывает сомнения. Работа очень своевременная.

Целью диссертационной работы М.Г. Холявка стало выявление общих закономерностей в формировании инулиназами, полученными из разных источников, надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения и физико-химических условий протекания биокаталитических реакций, а также определение типов тех взаимодействий, которые возникают между молекулой фермента и матрицами различной химической природы.

Анализируя структуру диссертационной работы Холявка М.Г., можно отметить, что она написана не по традиционному плану, когда текст включает отдельно написанный литературный обзор и большой раздел, как правило, с собственными результатами и их обсуждением. В данном случае автор представляет материал диссертации оригинальным образом: первоначально излагается небольшая глава, в которой содержатся только литературные данные, раскрывающие общую классификацию инулиназ на

эндо- и экзоинулиназы, а также дается общее представление о механизме действия инулиназ и участии отдельных аминокислотных остатков этих ферментов в каталитическом акте. При этом автор четко указывает на то, что у инулинз можно выделить 2 домена – С и N, но на стр.22 пишет, что есть еще какие-то А и G-домены, последний расположен «между 5-лопастным β -пропеллером и β -сандвичем вдали от активного центра», однако нигде, к сожалению, на рисунках в диссертации не обозначено начало отсчета этих лопастей, и нет ясности, что это за домены.

Затем следует в тексте диссертации «традиционный» раздел «материалы и методы» с описанием основных объектов исследования, способов их подготовки к этому исследованию и представлением основных методик, которые использовались автором в работе.

Основная часть экспериментальных результатов автора разделена далее на 4 отдельные главы, в которых собственные данные автора тесно переплетены с данными, известными из литературы по объектам исследования, что позволяет Холявка М.Г. анализировать их в совокупности, обобщать и выделять общие характеристики инулиназ и закономерности происходящих с ними процессов. При этом в начале каждого из этих разделов приводятся сведения, которые автор грамотно соотносит с каждым последующим шагом в своем исследовании. В целом вся информация в тексте изложена в сопровождении критического осмысления её автором.

Кроме того, текст диссертации содержит отдельную главу с заключением, выводами, списком использованной литературы, который включает 351 литературный источник, из которых 58 – на русском языке, остальные на английском, из которых 140 ссылок на работы, опубликованные за последние 10 лет, что свидетельствует о том, что автор диссертации хорошо осведомлен о современном уровне развития науки в области, в которой проводилось данное исследование. Материалы диссертации изложены на 392 страницах и иллюстрированы 166 рисунками и 65 таблицами.

Из наиболее значимых результатов, полученных автором в диссертационной работе, хочется выделить совмещение применения компьютерного моделирования, проводимого методом последовательного (каскадного) докинга, с результатами ИК-спектроскопии анализируемых реальных образцов при разработке необходимой последовательности действий для выявления молекулярного механизма сорбционной иммобилизации инулиназ на носителях, имеющих разную химическую природу. Именно это позволяет осуществлять направленное совмещение свойств носителя и фермента, и, по сути, создавать новые композитные материалы с новыми свойствами – максимально возможной каталитической активностью и стабильностью в её проявлении.

Автором отмечено, что на сегодняшний день обязательным этапом при создании биокатализаторов для пищевой промышленности является проверка их токсичности и мутагенности. В этой связи впервые автором диссертации

цитотоксичность полученных биокатализаторов была проверена на линии MCF7 клеток рака молочной железы человека, а мутагенная активность сорбентов для иммобилизации инулиназ была протестирована на клетках *Salmonella typhimurium* TA100.

Отдельно необходимо отметить проведенный в диссертационной работе огромный объем разносторонних исследований, результаты которых подтверждены статистическими данными, не вызывающими никаких сомнений и составляющих основу сделанных автором выводов.

Все результаты, полученные и представленные автором в диссертации, являются приоритетными. **Научно-практическая значимость работы** не вызывает сомнений, поскольку представленные в диссертации данные по каталитическим характеристикам разных инулиназ, и в частности конкретно исследованной инулиназы из клеток *Kluyveromyces marxianus* Y-303, обладавшей наименьшим среди ферментов из других источников значением K_m и высоким значением V_{max} , подтверждают очевидную возможность их перспективного практического применения. То есть представленная работа позволяет не только углубить и расширить научные знания по свойствам инулиназ из различных источников выделения, но и ориентироваться на возможность решения ряда прикладных задач, связанных с их использованием. При этом знания о процессе ферментативного гидролиза инулина позволяют рассчитывать на усовершенствование существующих технологических путей получения фруктозы и фруктоолигосахаридов в том числе для различных функциональных и диетических продуктов.

Обнаруженные автором диссертации эффекты, оказываемые разными факторами на различные инулиназы, находящиеся в свободном и иммобилизованном виде, в исследуемых условиях проведения ферментативной реакции, могут быть рекомендованы для принятия во внимание соответствующими специалистами при разработке новых ферментных препаратов инулиназы, в ожидании проявления ими определенных каталитических свойств, а также в интерпретации полученных результатов. Данные, полученные в этой ёмкой работе, несомненно могут быть использованы в образовательных курсах по «Биофизике» в высших учебных заведениях.

Анализируя работу в целом, необходимо отметить, что она написана последовательно, логично и хорошо оформлена. Представленные в работе рисунки и таблицы наглядно иллюстрируют полученные автором результаты. Каждый раздел завершается кратким резюме (в виде отдельного абзаца), содержащим основной вывод по представленным научным результатам, что позволяет проследить логику изложения этой весьма объемной работы.

Автореферат диссертации полностью соответствует содержанию представленной диссертационной работы.

Что касается содержания самой диссертации, то в качестве замечаний можно отметить следующее:

- в разделе «Материалы и методы» дана избыточная информация по общему использованию выбранных автором носителей для иммобилизации инулиназ, принципе, лежащем в основе метода определения белков по Лоури, но при этом полностью отсутствует описание условий проведения собственных экспериментальных исследований по установлению температурного и рН оптимумов действия инулиназ, определению их термостабильности, а именно нет величины рН среды и концентрация ферментов (эти условия не указаны и в подписях к соответствующим рисункам 30-33 в диссертации);

- в разделе 4.8 представлены результаты по воздействию УФ на свойства инулиназ, однако мотивация актуальности проведения именно этих исследований и именно в том варианте, как он был реализован в диссертации остается не совсем ясной, поскольку, как правило, изменения в структуре и свойствах инулиназ появляются после облучения целых клеток микроорганизмов, продуцирующих эти ферменты, и их облучение УФ приводит к изменениям инулиназ, которые детерминируются на генетическом уровне;

- в разделе «Материалы и методы» указан всего 1 источник инулина, применявшегося в работе - это коммерческий препарат инулина от компании MP biomedical из корня цикория, и для него приведены его характеристики как вещества. А в самой работе применяются еще 8 типов инулина (из топинамбура, лука, георгина, одуванчика и т.д.), взятых в виде экстрактов в исследование каталитических характеристик инулиназ, однако характеристики этих субстратов (и экстрактов, их содержащих) в работе отсутствуют;

- в диссертации присутствуют неудачные интерпретации и выражения (например «остатки активного центра», «экспрессия инулиназ», и др. Так в Табл.12 даны вперемешку величины удельных активностей разных инулиназ и значения константы V_{max} , а все это озаглавлено не совсем корректно как « V_{max} »;

- думается, что схемы процессов ассоциации-диссоциации, представленные в виде нескольких таблиц в разделе 4 диссертации (это рис.4-8 в автореферате) следовало бы назвать таблицами, а не рисунками.

Но в целом, сделанные замечания не умаляют значимости представленной на оппонирование диссертационной работы, тем более что основные ее результаты имеют большую практическую и фундаментальную значимость.

Результаты данной диссертации были достаточно широко представлены научной общественности, поскольку они были многократно (более 20 раз) доложены на международных конференциях и конгрессах. Основные положения диссертационной работы полноценно изложены в автореферате и отражены в двух монографиях и 27 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

Подводя итог изложенному выше мнению, следует заключить, что диссертационная работа Холявка М.Г., безусловно, является оригинальным экспериментальным исследованием, которое выполнено на высоком современном методическом уровне, и представляет собой цельный законченный научный труд, который вносит существенный вклад в развитие биофизики белков, в частности, инулиназы, понимание закономерностей образования надмолекулярных комплексов этого фермента, молекулярных механизмов его адсорбционной иммобилизации и получаемых в результате этого каталитических характеристик сформированных ферментных препаратов.

В целом, по объему выполненных исследований, научному и методическому уровню их проведения, по новизне и практической значимости полученных результатов данная диссертационная работа, представленная на официальное оппонирование, она удовлетворяет требованиям п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 (ред. от 28-08-2017), предъявляемым ВАК Министерства образования и науки РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор – Холявка Марина Геннадьевна – заслуживает присуждения ей искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Заведующая лабораторией экобиокатализа
кафедры химической энзимологии
Химического факультета ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова», доктор
биологических наук, профессор



Ефременко
Елена Николаевна

И.о. декана Химического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова,
член-корреспондент РАН, профессор
E-mail: elena_efremenko@list.ru
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1,
стр. 3
тел. +7-495-939-31-70
г. Москва, «04» июня 2018 г.



Калмыков
Степан Николаевич