

## О Т З Ы В

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

Рецензируемая диссертационная работа посвящена одной из ключевых задач физико-химической биологии – поиску корреляций между структурным состоянием белка и его функциональной активностью. Автор диссертации, Холявка М.Г., исключительно ответственно подошла к поставленной задаче и провела широкомасштабные исследования структуры, комплексообразования и каталитической активности одной из карбогидраз. Исследования затронули структурно-функциональные, физико-химические и кинетические свойства инулиназ из различных природных источников – ферментов, участвующих в разнообразных физиологических процессах, таких, как углеводный метаболизм работа сигнальных систем, контроль процессов клеточной дифференцировки и развития органов. Подробно исследованы закономерности формирования инулиназами надмолекулярных комплексов, каталитическая активность ферментов в составе комплексов и ее регуляция за счет перестройки молекулярной структуры в различных условиях. Все это определяет **фундаментальное значение** диссертационной работы.

Исследования, выполненные в рецензируемой докторской диссертации, имеют важную прикладную направленность. Инулиназы могут быть использованы в технологиях производства сахаров с различной степенью полимеризации, компонентов функционального питания, в том числе снижающих риск возникновения сахарного диабета, кариеса и ожирения. Потенциальное технологи-

ческое значение имеют проведенные исследования и полученные результаты по особенностям иммобилизации гликозидаз, механизмам стабилизации иммобилизованных ферментов в условиях изменения рН, температуры и строения иммобилизующего фермент носителя. Поэтому диссертационная работа, выполненная Мариной Геннадьевной Холявка, имеет большое **практическое значение**.

Сочетание фундаментальной и прикладной значимости делает выполненную работу исключительно **актуальной**.

Несмотря на то, что постоянно появляются все новые результаты по взаимосвязи структуры и свойств (активности) ферментов в различных условиях, новые данные, новые комбинации характеристик микроокружения заставляют с новых позиций взглянуть на хорошо известные ферментные системы. В рецензируемой докторской работе получено большое количество результатов, включая экспериментальные данные и сделанные выводы, которые полностью соответствуют критерию **новизны**. Например, для изучения надмолекулярной организации инулиназ в условиях изменяемого микроокружения предложен комплексный подход, основанный на широком наборе взаимодополняющих современных биофизических методов. Впервые выявлены закономерности образования инулиназой надмолекулярных комплексов в различных внешних условиях. Предложены схемы отдельных этапов ответной реакции инулиназ различного происхождения на воздействие высоких температур, высоких и низких значений рН среды, УФ-излучения. Впервые разработан алгоритм для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы с использованием методов каскадного докинга и ИК-спектроскопии. Созданы новые математические модели регуляции активности свободной и иммобилизованной инулиназы в условиях изменения температуры, рН, концентрации субстрата.

**Достоверность** полученных результатов обеспечена грамотной постановкой задачи и квалифицированным использованием комплекса взаимодополняющих биофизических методов и подходов. Достоверность и высокое качество полученных результатов подтверждена большим количеством высококачественных публикаций и всесторонним обсуждением результатов работы в международной печати и на различных конференциях и симпозиумах.

Диссертационная работа Холявка М.Г., общим объемом 392 страницы, состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (351 наименование), содержит 166 рисунков и 65 таблиц.

Во **введении** автором обсуждена актуальность темы диссертационной работы, степень ее проработанности, сформулирована цель работы, основные положения диссертации, выносимые на защиту, научная новизна и практическая ценность. Там же, во введении, приведены основные формальные сведения об апробации работы, публикациях, объеме и структуре диссертации.

**Первая глава** диссертации, позиционируемая автором, как литературный обзор, посвящена введению в проблему исследования. В ней на основе литературных данных дана характеристика структурно-функциональных свойств инулина из различных продуцентов, обсуждается механизм гидролиза инулиназами полифруктанов. Поскольку я здесь касаюсь опубликованной литературы, сразу остановлюсь на своем первом замечании – форме представления библиографии. Несмотря на то, что в тексте литературные ссылки соответствуют ГОСТу, найти их в библиографическом списке зачастую представляет большую проблему. Например (иду прямо по тексту), на первой странице литературного обзора (стр. 14) вторая ссылка звучит, как «Vasso A., 2010». Однако найти ее в библиографическом списке большая проблема – нужно зайти в интернет, набрать этого автора, найти его публикации 2010 года и по ним, по первой букве заглавия статьи, постараться определить, на какую-же работу ссылается ав-

тор диссертации. Пройдя на этом примере указанный путь, я обнаружил иско- мую ссылку под № 135, которая начиналась не с фамилии первого автора (ла- тинская “В”), а по названию статьи «Endo- and exo-inulinases: enzyme-substrate interaction and rational immobilization» на букву “Е”. Кстати, если фамилия рас- пространенная, то это сделать тоже не так просто и нужно добавлять ключевые слова из текста диссертации. Такое построение библиографии оказалось настолько непривычным, что я не поленился сделать следующий анализ. Оказа- лось, что 206 из 351 ссылки оформлены таким образом. А остальные оформле- ны в соответствии с ГОСТом. Причем, обнаружить какую-либо логику в выборе автора одного или второго представления ссылки мне не удалось. Все дано впе- ремешку. Работать с таким списком литературы крайне сложно.

**Вторая глава** традиционно посвящена информации об объектах и методах исследования. К сожалению, зачастую эта информация достаточно скудна и не позволяет в полной мере оценить все подготовительные и измерительные меро- приятия, выполненные автором для подготовки и проведения таких сложных, комплексных исследований. Кроме одной ссылки на стр. 32 (Холявка М.Г., 2010) отсутствует информация о методах выделения инулиназ и методах их очистки. Конечно, электрофореграммы, приведенные в следующей главе, поз- воляют получить определенное представление о степени чистоты и гомогенно- сти используемых белковых препаратов, но информация о подготовительных процессах была бы полезна. Очень скупо дана информация о методических тон- костях использованных биофизических методах. Например, практически отсут- ствует методическое описание применения метода ИК-спектроскопии, несмотря на то, что данные ИК-спектроскопии составляют значительную часть всего экс- периментального материала. Совершенно непонятно, каким образом проводи- лась оценка содержания вторичных структур белков. Ссылки на закон Бугера- Ламберта-Бера совершенно недостаточно. Наверняка применялся тонкий анализ

формы ИК-спектров (Jackson, M., et. al. 1995. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 30:95–120; Byler, D. M., et.al. 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. Biopolymers. 25:469–487), без чего в принципе невозможно сделать оценку состава вторичной структуры, но ссылка на это, почему-то, в тексте отсутствует.

**Глава 3** посвящена результатам структурных особенностей инулина из различных продуцентов с акцентом на надмолекулярную организацию ферментов. В целом результаты, представленные в главе, дают четкое представление о структурном состоянии исследуемых систем и успешно используются диссертантом для построения своей концепции. Однако, и здесь я не могу обойтись без замечаний. Что касается атомно-силовой микроскопии, то даже взятые в кавычки терминов «длина» и «ширина» молекулы не корректны. Во-первых, такой терминологии для характеристики молекул белков просто не существует, а во-вторых, кажущееся превышение «длины» над «высотой» на рис. 7-13 является следствием того, что «длина» не имеет ничего общего с геометрией молекул – это просто методическая особенность метода АСМ.

Другой блок замечаний связан с описанием и анализом данных инфракрасной спектроскопии (ИК). В принципе это замечание относится и к последующим разделам работы, где анализируются данные ИК.

1. При описании экспериментальных данных недостаточно представлены оригинальные спектры, что в ряде случаев затрудняет анализ выводов автора. Зачастую без иллюстраций экспериментальными спектрами и обоснования ссылками на литературу, приводимая интерпретация спектров не является однозначной (Табл. 29, стр.227-228).

2. Образцы белков и их комплексов с ионообменными носителями исследованы в виде сухих порошков, полученных лиофилизацией из раствора в ацетат-

ном буфере. Эта методика не позволяет провести нормировку спектров и, соответственно, корректно сопоставить относительные изменения в спектрах различных образцов. Приведенные в диссертации ИК-спектры содержат значительные искажения вследствие рассеяния, свойственные данной методике. Кроме того, при высушивании происходит концентрирование солей буфера. С учетом того, что использовался ацетатный буфер, паразитное влияние полос ацетата на спектр белка может быть значительным, о чем свидетельствуют интенсивные полосы поглощения в спектре «чистого» белка на 1730, 1550, 1240, 1050 и 700-900 см<sup>-1</sup>, свойственные ацетату. Возможно, автор применял вычитание спектра сухого ацетата из спектров комплексов, однако в тексте упоминаний об этом я не нашел. Однако и в этом случае интерпретировать спектральные изменения следует крайне осторожно, поскольку при высушивании усиливается комплексирование ацетат-иона с собственным противоионом и с ионами носителя, что вызывает сдвиги спектральных полос и не позволяет добиться полной компенсации. В итоге, автор зачастую дает изменениям в спектрах интерпретацию, которая вызывает вопросы.

3. Часть отнесений полос не верна. Полосу 1050 см<sup>-1</sup> автор относит к поглощению амидIV пептидных групп, хотя соответствующая полоса расположена в области 625-770 см<sup>-1</sup>. В другом месте (стр. 314) полоса 1050 см<sup>-1</sup> отнесена к валентным колебаниям C-N связи. Хотя общеизвестно, что полоса 1050 см<sup>-1</sup> (а точнее, целый ряд полос в интервале 1100 – 1000 см<sup>-1</sup>) обусловлена поглощением связи C-O, например, в составе того же ацетата или гликозидного кольца носителя (хитозана). При анализе спектров автор не учитывает, что в интересующей его области 2200-2400 см<sup>-1</sup> наблюдается сильное поглощение атмосферного CO<sub>2</sub>.

**В четвертой главе** диссертации приведены результаты исследования физико-химических и кинетических свойств инулиназ. В главе подробно исследо-

вано влияние внешних факторов (температура, pH среды, УФ-облучение) на надмолекулярное состояние ферментов. Убедительно показаны возможные подходы к регуляции надмолекулярного состояния инулиназы и, в дальнейшем, каталитической активности фермента. Небольшое замечание по главе связано с методом динамического светорассеяния, данные по которому приводятся в 3 и 4-й главах. К сожалению, не приводятся исходные данные с приборов, которые позволяют оценить степень подготовки и соответствия исследуемых образцов применяемому методу.

**Глава 5** посвящена результатам разработки гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназ. Методами компьютерного моделирования выполнен виртуальный скрининг лигандов для иммобилизации инулиназы. Разработан алгоритм для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы с использованием методов последовательного (каскадного) докинга и ИК-спектроскопии. Проанализированы молекулярные механизмы адсорбции ферментов на нерастворимых носителях. Проведен сравнительный анализ сорбционных свойств разных носителей.

**Глава 6** посвящена поиску механизмов регуляции активности гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназ. Проанализированы оптимумы функциональной активности ферментов, иммобилизованных на разных носителях. Исследовано влияние таких факторов, как концентрация субстрата, pH среды и температура на функциональные свойства исследованных биокатализаторы. Проанализированы гено- и цитотоксичность сконструированных биокатализаторов. Обоснован один из основных выводов диссертации об иммобилизации, как одном из перспективных путей регулирования активности инулиназ.

Кроме замечаний, сделанных по тексту отзыва, каких-либо других существенных замечаний по работе не имею. Сделанные замечания касаются в основном формы представления экспериментальных данных и не затрагивают до-

стоверности полученных результатов, их обсуждения и сформулированных выводов.

Диссертационная работа, выполненная Мариной Геннадьевной Холявка является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором широкомасштабных исследований с применением комплекса биофизических и кинетических методов молекулярной и надмолекулярной структуры инулиназ, механизмов формирования надмолекулярных комплексов инулиназами и особенностей адсорбции ферментов на различных нерастворимых носителях, анализа каталитической активности инулиназ в отношении различных субстратов сформулированы базовые принципы взаимосвязи структуры и функциональной активности карбогидраз при вариации надмолекулярной структуры и в условиях различного микроокружения, что является принципиально новым вкладом в один из разделов физико-химической биологии и биофизики. Прикладное значение работы определяется разработанными принципами конструирования биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов на различных нерастворимых носителях и оптимизацией условий их функционирования.

Полученные в диссертационной работе результаты представляют теоретическое и практическое значение и могут быть использованы в образовательных и научно-исследовательских центрах, работающих по профилю физико-химической биологии, биофизики и биотехнологии.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные материалы диссертации.

По актуальности решаемых проблем, достоверности полученных экспериментальных результатов и перспективам их дальнейшего использования рецензируемая диссертационная работа «Исследование физико-химических, структурно-функциональных свойств инулиназ и закономерностей формирова-



ния ими надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения» соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N 842 (ред. от 28.08.2017), предъявляемым ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор – Холявка Марина Геннадьевна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02. – Биофизика.

04.06.2018

Д.х.н., проф., заведующий лабораторией биофизической химии наносистем Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр» Российской академии наук

Подпись Зуева Ю.Ф. заверяю.

Заведующий канцелярией

ФИЦ КазНЦ РАН



Зуев Ю.Ф.

Митрофанова А.И.

Почтовый адрес 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я 30

Телефон: +7(843)2319036

Адрес электронной почты: yufzuev@mail.ru; zuev@kibb.knc.ru