



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

10.05.2018

№ 12307-2171-415

На №

от

УТВЕРЖДАЮ

Директор федерального
государственного
учреждения «Федеральный
исследовательский центр
«Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской
академии наук» (ФИЦ
Биотехнологии РАН),

д.х.н., профессор,
член-корреспондент РАН
В.О. Попов



2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Актуальность темы обусловлена значимостью фундаментальных исследований особенностей структуры и свойств карбогидраз в условиях различного микроокружения при создании новых материалов для медицины, биотехнологии, экологии и других областей знаний. Изучение структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств инулиназ (КФ 3.2.1.7) в нативном и иммобилизованном состояниях имеет высокое теоретическое и прикладное значение. Эти ферменты участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют важную роль в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития органов. Инулиназы могут быть использованы в циклах производства сахаров с различной степенью полимеризации, в частности, фруктозы и фруктоолигосахаридов –

неотъемлемых компонентов функционального питания, снижающих риск возникновения сахарного диабета, кариеса и ожирения.

В целом, вопросам стабилизации гликозидаз путем иммобилизации, а также разработке условий получения и применения гетерогенных биокатализаторов на их основе посвящено относительно небольшое число работ (Altunbas et al. 2013, Mohamed et al. 2014; Garlet et al. 2014, Trytek et al. 2015; Fernandez-Arrojo et al. 2015), большинство из которых носит эмпирический характер. При этом, дополнение экспериментальных техник современными методами компьютерного и математического моделирования позволяет не только экономить материальные ресурсы на проверке иммобилизационных агентов и выявлять механизмы процесса иммобилизации, но и создавать принципиально новые комплексы препаратов путем направленного конструирования материалов (лигандов, подложек, сшивок).

Развитие производства пищевых продуктов функционального назначения относится к основным задачам государственной политики в области здорового питания, сформулированным в «Основах государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года». Для выполнения поставленных задач требуется проведение научных исследований в области фундаментальных основ процессов иммобилизации и последующего применения промышленно значимых ферментов, в том числе инулиназ.

Исследования иммобилизованных карбогидраз в ближайшие годы несомненно позволят расширить наши представления о процессе ферментативного гидролиза полисахаридов и усовершенствовать существующие технологические пути получения фруктозы и фруктоолигосахаридов.

В связи с этим следует признать актуальной тему диссертационной работы Холявка М.Г., посвященной исследованию физико-химических, структурно-функциональных свойств инулиназ и закономерностей формирования ими надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения, в том числе при иммобилизации на матрицах нерастворимых носителей.

Степень обоснованности, достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Для достижения цели исследования были поставлены адекватные задачи, которые удалось решить с использованием широкого набора классических и современных биофизических и биохимических методов исследований, а именно атомно-силовой микроскопии, динамического светорассеяния, инфракрасной спектроскопии, гель-проникающей хроматографии, электрофореза, молекулярного докинга, математического моделирования. Достоверность представленных результатов подтверждается обширным экспериментальным материалом и статистической обработкой данных.

Результаты диссертационной работы являются приоритетными. Научно-практическая значимость рукописи не вызывает сомнений. Автором впервые выявлены закономерности образования надмолекулярных комплексов ферментом инулиназой при ее различных концентрациях в системе (от 10^{-8} до $5 \cdot 10^{-4}$ М), при действии УФ-облучения в дозах 151-6040 Дж/м², при варьировании величин рН (3,0-8,5) и температуры (20-95 °С). Разработан алгоритм для составления быстрых прогнозов относительно пределов колебаний физико-химических и кинетических характеристик молекул инулиназ. Предложены схемы отдельных этапов ответной реакции инулиназ различного происхождения на воздействие высоких температур, высоких и низких значений рН среды, УФ-излучения (240-390 нм). Разработан алгоритм для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы с использованием методов последовательного (каскадного) докинга и ИК-спектроскопии. Созданы математические модели зависимости активности свободной и иммобилизованной инулиназы от значений температуры, рН, концентрации инулина (до 1,2 мМ), а также модель учета кинетики реакции как инструменты для понимания и прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде. Впервые оценены генотоксические и цитотоксические свойства препаратов инулиназы, иммобилизованной на синтетических носителях АВ-17-2П, КУ-2, КУ-2-8чС, ВИОН КН-1.

Результаты исследования являются новыми. Научные положения настоящей работы расширяют и углубляют современные представления о механизмах формирования инулиназами из различных продуцентов надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения.

Приведенные в работе научные положения, выводы и рекомендации аргументированы, основаны на фундаментальных научных положениях, общепринятых теоретических закономерностях, опираются на экспериментальные данные и являются их логическим следствием. В работе нет взаимно противоречивых выводов.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы. Основные результаты работы получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов. Личный вклад соискателя состоит также в обработке, интерпретации, анализе и апробации экспериментальных данных и подготовке публикаций по выполненной работе.

Полнота изложения основных результатов диссертации в публикациях автора. Представленные результаты прошли широкую апробацию на международных и всероссийских научных конференциях, симпозиумах и съездах в форме устных докладов и стендовых сообщений. Основные результаты диссертационной работы отражены в 85 публикациях, из них 1 монография, 1 глава в зарубежной коллективной монографии; в перечень ВАК или МБД входят 27, в Scopus – 14, в Web of Science – 6.

Рекомендации по использованию результатов исследования. Результаты диссертационной работы могут способствовать созданию опытных технологических установок для гидролиза инулин-содержащего растительного сырья с целью получения фруктозы. Кроме того, материалы диссертации могут быть использованы в учебном процессе при чтении лекций спецкурсов по химической энзимологии, физико-химической биологии, биофизике в Воронежском государственном университете и ряде других учебных и научных центров России, а также в ходе выполнения выпускных квалификационных

работ студентами кафедры биофизики и биотехнологии.

Замечания по диссертационной работе. В диссертационной работе для характеристики размеров олигомерных форм инулиназ широко используется метод динамического светорассеяния. Однако детали использования этого метода описаны слишком лаконично. Следовало бы более подробно изложить физические основы метода, привести формулу для расчета гидродинамического радиуса частиц и, главное, при обсуждении размеров частиц привести исходные экспериментальные данные, а именно распределения частиц по размерам. Осталось неясным, как можно использовать данные динамического светорассеяния для оценки процентного содержания частиц.

Из диссертации не совсем ясно, насколько информативными являются данные ИК-спектроскопии для характеристики иммобилизованных инулиназ.

Следовало бы подробнее описать, как зависит вид полученных методом атомно-силовой микроскопии изображений инулиназ от условий измерения (таких, как радиус острия кантелевера, материал подложки и др.).

Проведенное диссертантом разложение профиля дифференциальной сканирующей калориметрии для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на гауссовы компоненты (рис. 35) не совсем корректно, поскольку такой способ разложения справедлив только для обратимо денатурирующих белков.

При проведении докинга диссертант в качестве модельного соединения использовал "виртуальный" фрагмент соответствующего ионообменника. Однако сам носитель (анионо- или катионообменник), используемый в работе, представляет собой нерастворимый объект (например, полученный на основе сшитого сополимера стирол-дивинилбензол) и не обладает достаточной гибкостью при взаимодействии с инулиназой. Таким образом, предлагаемая модель не является в полной мере аналогом процессов, протекающих при иммобилизации фермента.

В разделе 6.2.4 (стр. 299) для анализа температурной зависимости активностей свободной и иммобилизованной инулиназ использована формула, предложенная Э.Корниш-Боуденом. Эта формула содержит изменения

энтальпии и энтропии, которые, как пишет диссертант, относятся к ферментативной реакции. На самом деле, изменения энтальпии и энтропии в обсуждаемой формуле относятся к стадии обратимой денатурации фермента.

Не проведена проверка операционной стабильности образцов иммобилизованной инулиназы.

Следует отметить, что сделанные замечания не касаются существа диссертационной работы и не умаляют значимости полученных в ней результатов.

Заключение. Диссертационная работа М.Г. Холявка является самостоятельным и законченным исследованием, в котором сформулирован ряд научных положений, являющихся новыми по своей постановке и предлагаемым направлениям решения.

Диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (редакция от 28.08.2017 г.), предъявляемых ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Холявка Марина Геннадьевна, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.02 – биофизика.

Отзыв рассмотрен и одобрен на совместном семинаре лабораторий структурной биохимии белка, инженерной энзимологии и молекулярной инженерии (протокол № 3 от 18 апреля 2018 года).

Заведующий лабораторией структурной биохимии белка
федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук»
(ФИЦ Биотехнологии РАН),
доктор биологических наук, профессор


Д.И. Левицкий

Почтовый адрес: 119071 г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
Тел.: +7 (495) 952-13-84
E-mail: levitsky@inbi.ras.ru

