

## Отзыв 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 учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02. – Биофизика

С каждым годом ферменты всё активнее используются в повседневной жизни. Их используют в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, в производстве парфюмерии, в медицине, в текстильной промышленности, при производстве моющих средств. В настоящее время без использования ферментов не обходится выпечка хлеба – с помощью ферментов улучшают свойства теста. Современное животноводство немыслимо без ферментативной обработки кормов животных – так достигается увеличение питательной ценности кормов и, следовательно, снижение затрат на получение продукции. Ферменты вносят в стиральные порошки целью эффективного удаления жировых и белковых загрязнений, смягчения тканей, улучшения его потребительских свойств.

В связи с растущими запросами промышленности получение новых эффективных катализаторов на основе ферментов является важной задачей. В мире постоянно ведется поиск новых ферментов и их продуцентов, а так же работы по улучшению свойств и способов применения существующих биокатализаторов. Прогресс в разработке новых биокатализаторов невозможен без изучения их физико-химических свойств, особенностей катализа ими реакций, реакций взаимодействия с ингибиторами и активаторами ферментов, особенностей структуры молекул ферментов.

Одним из способов изменения свойств ферментов целью их улучшения их потребительских свойств является иммобилизация ферментов – связывание молекул ферментов с носителем. Иммобилизация позволяет существенно повысить стабильность фермента, улучшить его потребительские свойства. В промышленности использование иммобилизованных ферментов очень удобно, поскольку позволяет использовать жесткие режимы технологических процессов, регенерировать биокатализатор. Поэтому важны исследования, моделирующие взаимодействие ферментов с матрицами носителей, изучающие закономерности катализа реакций иммобилизованными ферментами.

Инулиназами называют группу ферментов, катализирующих гидролиз полисахарида инулина, в результате чего образуются фруктоза и/или олигосахариды различной длины. Таким образом, с помощью данного фермента возможно получение фруктозы и фруктозных сиропов, которые активно используются в пищевой промышленности, в том числе для получения диабетических продуктов.

Всё это определяет **актуальность диссертационной работы** Холявка М.Г., касающейся изучения свойств, структуры и практического применения инулиназ. Целью работы являлось «изучение структурно-функциональных, физико-химических и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы, закономерностей формирования ферментом надмолекулярных комплексов в условиях разного микроокружения, определение типов взаимодействия между белковой глобулой и матрицами ряда синтетических ионитов и хитозана». Для достижения поставленной цели были выделены семь задач, включающих в себя круг работ по исследованию образования ферментом надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения; поиску лигандов и определению вероятных сайтов связывания ферментов с полимерной матрицей; изучение механизмов взаимодействия матрицы с ферментом в ходе адсорбционного взаимодействия; создание математических моделей зависимостей свойств инулиназы от различных параметров реакции; оценка биобезопасности ферментного препарата; изучение гидролиза растительного сырья инулиназами. Цель и задачи работы, безусловно, отвечают запросам современной науки и биотехнологии. Необходимо отметить широту охвата проблемы – от математического моделирования процессов, до разработки способов практического применения ферментного препарата.

**Обоснованность и достоверность полученных результатов.** В ходе выполнения работ было проведено большое количество экспериментов, выполнен значительный объём работы по математическому моделированию. В результате получен разноплановый фактический материал, который был систематизирован и изложен в доступной форме. При этом прослеживается внутренняя логика исследования – от исследования надмолекулярных структур инулиназ, математического моделирования взаимодействия фермента с матрицами носителя, до практических этапов работы – изучения свойств иммобилизованных инулиназ, изучения безопасности ферментных препаратов, исследования гидролиза растительного сырья инулиназами.

Обоснованность полученных результатов доказана большим объёмом экспериментальных результатов, их успешной интерпретацией, статистической обработкой. Достоверность исследований подтверждается рациональным выбором используемых методов – как то ИК, видимая/УФ – спектроскопия; дифференциально-сканирующая калориметрия, адсорбционная иммобилизация фермента, математическое моделирование. Результаты достаточно полно описаны в тексте диссертации и подробно отражены в графиках, сводных таблицах, диаграммах. Материалы диссертации представлены в 24 статьях, трёх материалах конференций, двух монографиях.

**Научная новизна исследования** определяется получением новых данных, существенно расширяющих современные представления о структуре и функциях инулиназ из различных

объектов. В работе изложена точка зрения автора о существовании олигомерных форм инулиназы в условиях различного микроокружения и роли этих олигомерных форм в ферментативном катализе; о механизмах сорбции инулиназы из различных источников на матрицах. Важной частью работы является моделирование связывания молекул фермента с матрицами в процессе адсорбционной иммобилизации. Несмотря на практическую важность иммобилизованных ферментов, до настоящего времени не найдено надежных способов, позволяющих предсказывать свойства фермента после его иммобилизации, а также эффективность сорбции молекул белка матрицей. Работа по моделированию сорбции инулиназы матрицами является уникальной и вносит большой вклад в возможности предсказания поведения ферментов после их иммобилизации. Созданы математические модели, описывающие поведение фермента при различных значениях температуры, концентрации инулина и pH, что также является существенным вкладом в понимание закономерностей протекания ферментативного катализа.

**Практическая значимость работы** определяется большим объемом данных о возможном прикладном использовании инулиназ. Автором проведена работа по изучению образования сахаров под воздействием инулиназ из растительного сырья – экстрактов топинамбура, девясила, цикория, луковиц георгина, и обнаружен высокий потенциал практического применения фермента. Показано отсутствие генотоксического и цитотоксического эффекта иммобилизованных инулиназ. Все эти данные, несомненно, важны с практической точки зрения и позволяют использовать разработанный биокатализатор в промышленности.

**Структура и содержание диссертации.** Диссертационная работа Холявка М.Г., изложена на 392 листах, содержит 166 рисунков и 65 таблиц. В состав работы входят введение; обзор литературы; раздел, описывающий материалы и методы, четыре главы с описанием результатов исследований и их обсуждением; заключение; выводы; список использованных источников и благодарности людям, содействовавшим выполнению работы.

Во «**Введении**» автор описывает существующую научную проблему, актуализирует цель исследования и задачи, обосновывает необходимость выполнения исследований для выяснения научной истины, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

В «**Обзоре литературы**» автором цитируются работы из изучаемой области исследований. Обзор литературы выполнен на 18 страницах и занимает незначительную часть работы. Однако это не снижает ценность представленной работы, поскольку большая часть ссылок на литературные источники приводится в ходе обсуждения полученных автором данных в главах, содержащих результаты исследований.

Обзор посвящён в основном структуре инулиназ из различных источников. Рассмотрены уровни первичной, вторичной и третичной организации молекулы фермента. Исследовано степень идентичности аминокислотных последовательностей инулиназ. Так же подробно рассмотрен механизм каталитического гидролиза инулина под воздействием инулиназ, описаны аминокислотные остатки, формирующие каталитический центр.

При прочтении раздела возникли следующие замечания:

1. В таблицах 1 и 2 удобнее было бы разделить столбец 4 на строки и указать в них, из какого конкретного источника были взяты данные, указанные в столбце 2. Это могло значительно облегчить поиск информации в ссылках.
2. На с. 15 написана фраза: «Инвертаза, фруктозилтрансфераза, леваназа, эндоинулиназа и экзоинулиназа входят в семейство гликозидаз...». Неясно, почему фруктозилтрансфераза отнесена к гликозидазам? Согласно номенклатуре ферментов, эти ферменты относятся к разным классам. Для некоторых ферментов дано тривиальное название, поэтому необходимо было указать шифры классификации ферментов (КФ).
3. На с.18 автор указывает принадлежность некоторых ферментов к семействам гликозил-гидролаз и обозначает эти семейства как ГН. Для лучшего понимания текста было бы лучше объяснить, что такое семейства гликозил-гидролаз и расшифровать их обозначение.

В главе «**Материалы и методы**» описаны объекты и методы исследования, используемые в работе. Эти методы адекватны поставленным задачам и включают современные аналитические, математические, физико-химические методы и способы обработки данных.

В ходе прочтения раздела возникли следующие замечания:

1. В разделе 2.1. на с. 32 не указан номер и источник штамма *Kluyveromyces marxianus*. В главах, описывающих результаты работы, указано, что работы так же проводились с инулиназой гриба *Aspergillus ficuum*. В указанном разделе фермент из этого продуцента, как объект исследований, не указан.
2. В разделе 2.2.3 на с. 38 не указан способ определения концентрации продукта реакции.
3. В разделе 2.2.11 на с. 41 и 42 указано, что: «Соотношение типов вторичной структуры для инулиназ определяли, основываясь на законе Бугера-Ламберта-Бера...». Непонятно, каким образом с помощью закона Бугера-Ламберта-Бера можно рассчитать соотношение типов вторичной структуры в молекуле белка?
4. В разделе 2.2.16 на 46 указано, что: «Статистическая обработка полученных результатов проводилась традиционным способом...». Непонятно, что такое «традиционные способы» статистической обработки, и где с ними можно ознакомиться?

5. В главе «Материалы и методы» отсутствуют информация о методах получения и расчета кинетических параметров реакций, катализируемых инулиназой.

**Результаты исследований** изложены в главах 3 – 6. Изложение результатов автором проводится последовательно, с отражением поставленных задач и сопровождаются обсуждением полученных результатов. В главе 3 автором рассмотрены структурные особенности инулиназ, исследование закономерностей образования надмолекулярных комплексов инулиназы. В главе 4 проведён большой объём работ по изучению физико-химических и кинетических свойств инулиназ. В частности, изучены процессы ассоциации-диссоциации инулиназ при различных температурах и значениях pH, показано, что при оптимальных значениях pH и температуры инулиназа из различных источников находится в димерной форме. Изучен процесс термо- и УФ-индуцированной инактивации инулиназ. Глава 5 посвящена изучению взаимодействия инулиназы из различных источников с матрицами для иммобилизации. Проведена логичная работа, которая началась математическим моделированием процессов сорбции и завершилась получением гетерогенных препаратов иммобилизованного фермента. В главе 6 описана работа по исследованию физико-химических и кинетических свойств иммобилизованных инулиназ. Изучена зависимость активности гетерогенного катализатора от физико-химических факторов и концентрации субстрата. Проведена работа по возможности практического применения разработанного катализатора, показано, что его использование увеличивает выход продукта при гидролизе растительного сырья. Большим достоинством глав, описывающих результаты, является обсуждение результатов, совмещённое с их изложением. Такая подача материала значительно облегчает его понимание, и позволяет оценить вклад представленной работы в современную науку.

В ходе прочтения раздела возникли следующие замечания и вопросы:

1. На с. 48 – 51 в таблице 3 для некоторых продуцентов указано, что инулиназа была экспрессирована в данный организм. Необходимо было указать не экспрессионную систему, а источник генов.
2. На с. 71 таблица 9 называется «Оптимумы функционирования и кинетические характеристики препаратов инулиназы». Однако в таблице нет кинетических характеристик, приведены данные о pH и температурном оптимумах.
3. На с. 83 указано: «...при инкубации в 0,1 М ацетатном буфере с pH 3,0...». Непонятно, о каком буфере идёт речь? Значение pK Na-ацетатного буфера составляет 4,75, следовательно, буферные свойства он проявляет в диапазоне pH 3,7 – 5,6.
4. На с. 91 в таблице 12 указано значение  $K_m$  инулиназ. В разделе 2.1 главы 2 не приведено значение молекулярной массы субстрата – инулина. Какую молекулярную массу инулина использовали для расчёта его молярной концентрации?

5. На с. 187 указано, что пространственная структура инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* была реконструирована на основе структуры инвертазы из *Saccharomyces cerevisiae*. Является ли такая реконструкция корректной? Согласно данным, представленным в таблице 15, идентичность последовательностей этих ферментов составила 51%.

6. Почему раздел 5.5. называется «Поиск сшивающего агента для сополимеризации инулиназы»? – В качестве сшивающего агента в работе использовали только глутаровый альдегид.

7. Неясно, о какой каталитической активности идёт речь на с. 326 и в таблицах 58 и 59. Согласно представленным данным биокатализатор находился в реакторе и, насколько это понятно из текста, измеряли степень гидролиза субстрата в реакционной смеси. Возможно, измеряли не активность фермента, а концентрацию продукта в реакционной смеси?

**Заключение** подводит итог проделанной работы. В заключении грамотно расставлены акценты, чётко сформулированы основные достижения проделанной работы.

**Выводы** в диссертационной работе вытекают из сущности проведённых исследований, сформулированы чётко и соответствуют задачам проведённого исследования и экспериментальному материалу, изложенному в разделах экспериментальной части диссертации.

В **Списке использованных источников** приводятся ссылки на 351 литературный источник. Список источников структурирован в алфавитном порядке. К сожалению, автор допустил небрежность в оформлении списка источников. В тексте диссертации цитирование приводится по первому автору работы, с его инициалами и годом публикации работы. В списке источников часть ссылок оформлена в соответствии с ГОСТ 7.1—2003 или ГОСТ Р7.0.5-2008. То есть, на первом месте в ссылке стоит автор. Однако в большом числе ссылок на первом месте стоит не имя автора работы, а название статьи. Это делает практически невозможным использование списка источников в печатном варианте диссертации, так как найти фамилию автора в большом массиве ссылок очень трудно.

В ходе прочтения раздела возникли следующие замечания.

1. На с. 18 приведена ссылка на работу T. Pons et al. (1998). В списке источников такой работы нет.
2. Для ссылки 164 указанный адрес интернет-ресурса не существует.
3. Для ссылки 225 указанный адрес интернет-ресурса не существует.
4. На с. 26 приведена ссылка на работу Park et al., 2003. В списке источников такой работы нет.
5. На стр. 40 указано: «..как описано в работе Пермякова С.Е. (2012)...». Однако работы Пермякова С.Е. за 2012 год в списке источников нет. Есть работа №253, но там имя написано в

английской транскрипции Permyakov S.E. Если в тексте идёт ссылка на эту работу, то необходимо было указывать английскую транскрипцию имени, как указано в самой работе.

6. В тексте нет ссылки на работу №190.

7. Многие ссылки в тексте неразличимы в списке литературы. То есть, в тексте указаны имя автора и год публикации работы, а в списке источников есть несколько работ автора с одинаковым годом. Поэтому, в таких случаях невозможно понять, на какую именно работу ссылается диссертант. Необходимо было вводить дополнительные обозначения в цитируемые работы.

- Ссылкам № 262 и 308 в тексте соответствует Rouwenhorst R.J., 1990;
- Ссылкам №297 и 299 в тексте соответствует Singh R.S. et al. (2007) или Singh R.S., 2007;
- Ссылкам №295 и 296 в тексте соответствует Singh R.S., 2017;
- Ссылкам № 266 и 350 в тексте соответствует Yokota A., 1991;
- Ссылкам №125 и 280 в тексте соответствует De Roover J., 1999;
- Ссылкам №227 и 228 в тексте соответствует Marx S.P., 1997;
- Ссылкам №274, 316, 333 и 334 в тексте соответствует Van den Ende W., 1996;
- Ссылкам №161, 162 и 163 в тексте соответствует Gill P.K., 2006;
- Ссылкам № 186 и 225 в тексте соответствует Letca D., 2004;
- Ссылкам № 281 и 205 в тексте соответствует Kang S.I., 1998;
- Ссылкам № 68 и 196 в тексте соответствует J. Allais et. al. (1987);
- Ссылкам № 32, 54 и 57 в тексте соответствует Шкутина И.В., 2004;
- Ссылкам № 14 и 15 в тексте соответствует Жеребцов Н.А., 2002;
- Ссылкам № 120 и 240 в тексте соответствует Nakamura T 1978;

8. В таблице 3 есть ссылка на работу Laloux O., 1989. В списке источников работы 1989 года такого автора нет.

В конце диссертации приводятся **Благодарности** коллегам, содействовавшим выполнению работы. Наличие таких благодарностей указывает на добросовестное отношение к вопросам авторства в определенных элементах работы, указывает на комплексный подход к работе и подчёркивает ценность собственных результатов автора диссертации.

Диссертационная работа Холявка Марины Геннадьевны представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу, представляющую собой решение крупной научной проблемы, имеющей большое практическое значение. Диссертационная работа по своей актуальности, научной новизне и практической значимости 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.

23 мая 2018 г.

Доктор биологических наук.

Леонтьевский Алексей Аркадьевич

Леонтьевский Алексей Аркадьевич:

Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрыбина.

web-сайт организации: <http://ibpm.ru/>

Должность: заведующий лабораторией микробной энзимологии

Адрес: 142290, г. Пущино, Московская обл., пр-т Науки, д. 5

e-mail: [boronin@ibpm.pushchino.ru](mailto:boronin@ibpm.pushchino.ru)

тел./факс: +7 (495) 956-33-70

*Подпись Леонтьевского А.А. удостоверено*  
*Ученый секретарь ИБФМ РАН,*



*Решетникова Т.А.*