

## О Т З Ы В

на автореферат диссертации 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 посвящена исследованию физико-химических свойств инулиназ, иммобилизованных на различных носителях путем физической адсорбции. Проведен огромный объем работ с использованием 13 адсорбентов, 4 ферментов различного происхождения, при этом условия реакции варьировались в достаточно широких пределах концентраций ферментов, температур и значений pH. В результате раскрыты особенности физико-химических, кинетических и структурно-функциональных свойств свободных и иммобилизованных инулиназ, проанализированы методы регулирования их активности. В работе установлены кинетические параметры гетерогенных биокатализаторов, приготовленных путем адсорбции ферментов, в том числе, инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*, на коммерческих катионитах и анионитах, а также на хитозане. Обсуждены перспективы развития биокаталитических процессов с использованием твердых (гетерогенных) биокатализаторов – иммобилизованных инулиназ, в процессах гидролиза инулина до фруктозных сиропов.

Научная новизна работы заключается в том, что разработаны и успешно использованы методы компьютерного моделирования взаимодействия белковой молекулы инулиназы с поверхностью катионита. Методами последовательного каскадного докинга сделаны выводы о природе адсорбционного взаимодействия в зависимости от природы адсорбента и фермента.

В диссертационной работе Холявка М.Г. получены и описаны результаты, в основном, фундаментального характера. В связи с этим актуальность и научная новизна выбранной соискателем темы работы не вызывает никаких сомнений. Практическая значимость работы заключается в том, что предложены способы приготовления отечественных биокатализаторов для практически важных процессов гидролиза инулина из возобновляемого растительного сырья и получения ценного рыночного продукта пищевой и фармацевтической промышленности – фруктозного сиропа.

Результаты работы Холявка М.Г. обсуждены на 18 научных Форумах, включая крупные Европейские Международные Конгрессы. По результатам работы опубликованы 1 монография и 87 научных работ в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, и индексируемых в базах данных РИНЦ, Scopus и Web of Science.

При прочтении автореферата диссертации возникли некоторые вопросы; возможно, ответы на них содержатся в тексте самой диссертации. Следует отметить, что возникшие вопросы не изменяют высокую положительную оценку работы, выполненной Холявка М.Г.

*Вопросы:*

1. Несомненно, что иммобилизованные инулиназы найдут практическое применение как гетерогенные биокатализаторы гидролиза инулина. Какой из приготовленных и изученных автором биокатализаторов обладает максимальным практическим потенциалом?

Объясните, зачем проводилась оценка мутагенных, генотоксических и цитотоксических свойств иммобилизованной инулиназы? Означает ли это то, что фермент «вымывается» из биокатализатора, и тем самым загрязняет конечный продукт – фруктозный сироп?

К сожалению, в автореферате не приведены условия проведения биокаталитического процесса гидролиза инулина, а именно, концентрация исходного субстрата (инулина); активность и стабильность биокатализатора; данные о влиянии примесей в растворе субстрата (инулина) на эффективность процесса гидролиза; некоторые технологические параметры: тип реактора, время контакта.

2. Результаты, представленные в табл. 3 и рис. 9, а также выводы, сделанные авторами на основании представленных результатов (с. 17), нуждаются в детальном разъяснении. Во-первых, не очень понятно, что подразумевают авторы под термином «аффинность связывания». Судя по размерности (ккал/моль), это энергия взаимодействия каждого контактного участка с сульфогруппами катионита КУ-2, или это не так? Контактные участки инулиназы №5 и №4 удалены друг от друга, энергия их взаимодействия с КУ-2 практически одинакова. Означает ли это, что белковая молекула сильно деформируется???

3. Поясните, что такое «модель двух ферментов» (с. 21). В Табл. 6 и 7 обозначения, такие как «а»,  $pK_1$  и  $pK_2$ , а также аббревиатуры «модель-метод» cl:IP, ul:cG, следует пояснить.

На основании анализа приведенных в автореферате данных можно заключить, что диссертационная работа Холявка Марины Геннадьевны представляет собой законченную, выполненную научно-квалификационную работу, которая по актуальности, научной и практической значимости полученных результатов, объему и методическому уровню исполнения 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.

Считаю, что автору диссертационной работы **«Исследование физико-химических, структурно-функциональных свойств инулиназ и закономерностей формирования ими надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения»**, Холявка Марине Геннадьевне за совокупность научно обоснованных данных, результатом которых является существенный вклад в развитие представлений о закономерностях формирования надмолекулярных комплексов ферментов (на примере инулиназы), следует присудить ученую степень доктора биологических наук по специальности: 03.01.02. – Биофизика

Ведущий научный сотрудник  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт катализа СО РАН,  
д.х.н., профессор

Г.А. Коваленко

Подпись Г.А.Коваленко заверяю:

Ученый секретарь  
Институт катализа СО РАН  
д.х.н., профессор



Д.В. Козлов