

Протокол № 76

заседания диссертационного совета Д 212.038.03 по защите диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук от 26.06.2018 г.

Состав диссертационного совета утвержден в количестве 19 человек.

Присутствовали на заседании 14 человек.

Заместитель председателя: д.м.н., профессор Алабовский Владимир Владимирович.

Присутствовали: д.м.н., проф. Алабовский Владимир Владимирович, д.б.н., проф. Артюхов Валерий Григорьевич, д.б.н. Блинецова Галина Николаевна, д.б.н., доцент Вашанов Геннадий Афанасьевич, д.б.н., проф. Грабович Маргарита Юрьевна, д.б.н., проф. Епринцев Александр Трофимович, д.б.н., проф. Ершова Антонина Николаевна, д.б.н., проф. Калаев Владислав Николаевич, д.б.н., проф. Корнеева Ольга Сергеевна, д.б.н., доцент Наквасина Марина Александровна, д.б.н., проф. Попова Татьяна Николаевна, д.б.н., проф. Путинцева Ольга Васильевна, д.х.н., проф. Селеменев Владимир Федорович, д.фарм.н., проф. Сливкин Алексей Иванович.

Официальные оппоненты:

- Ефременко Елена Николаевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет» (ФГБОУ ВО «МГУ»), лаборатория экобиокатализа кафедры химической энзимологии, заведующая – присутствовала;
- Зуев Юрий Федорович, доктор химических наук, Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр» Российской академии наук, лаборатория биофизической химии наносистем, заведующий – присутствовал;
- Леонтьевский Алексей Аркадьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, лаборатория микробной энзимологии, заведующий – отсутствовал.

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Слушали: защиту диссертационной работы соискателя 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». Стенограмма прилагается.

Постановили: на основании протокола № 1 счетной комиссии считать, что диссертация Холявка Марины Геннадьевны отвечает всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02. – «Биофизика».

Результаты голосования: «За» – 14, «Против» – нет. «Недействительных бюллетеней» – нет.

По результатам работы принято следующее заключение:

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 212.038.03,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ «ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ», МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ, ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК
аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 26.06.18 № 76

О присуждении Холявка Марине Геннадьевне, гражданке РФ, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Исследование физико-химических, структурно-функциональных свойств инулиназ и закономерностей формирования ими надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения» по специальности 03.01.02 – биофизика принята к защите 20.03.2018 г., протокол № 68 диссертационным советом Д 212.038.03 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», Министерство образования и науки РФ, 394018, г. Воронеж, Университетская площадь, 1; приказ № 717/нк от 09.11.2012.

Соискатель Холявка Марина Геннадьевна, 1983 года рождения, работает доцентом кафедры биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета в ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Министерства образования и науки РФ.

В 2007 году окончила магистратуру по направлению «Биология» Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Воронежский государственный

университет».

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Исследование структурно-функциональных свойств гомогенных и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы» защитила в 2010 году в диссертационном совете Д 212.038.03, созданном на базе Воронежского государственного университета.

Диссертация выполнена на кафедре биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Министерства образования и науки РФ.

Научный консультант:

Артюхов Валерий Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», медико-биологический факультет, кафедра биофизики и биотехнологии, заведующий.

Официальные оппоненты:

- Ефременко Елена Николаевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет», лаборатория экобиокатализа кафедры химической энзимологии, заведующая.
- Зувев Юрий Федорович, доктор химических наук, профессор, Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр» Российской академии наук, лаборатория биофизической химии наносистем, заведующий.
- Леонтьевский Алексей Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, лаборатория микробной энзимологии, заведующий.

Дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва в своем положительном заключении, подписанном Левицким Дмитрием Ивановичем, доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией

университет».

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Исследование структурно-функциональных свойств гомогенных и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы» защитила в 2010 году в диссертационном совете Д 212.038.03, созданном на базе Воронежского государственного университета.

Диссертация выполнена на кафедре биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Министерства образования и науки РФ.

Научный консультант:

Артюхов Валерий Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», медико-биологический факультет, кафедра биофизики и биотехнологии, заведующий.

Официальные оппоненты:

- Ефременко Елена Николаевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет», лаборатория экобиокатализа кафедры химической энзимологии, заведующая.
- Зувев Юрий Федорович, доктор химических наук, профессор, Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр» Российской академии наук, лаборатория биофизической химии наносистем, заведующий.
- Леонтьевский Алексей Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, лаборатория микробной энзимологии, заведующий.

Дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва в своем положительном заключении, подписанном Левицким Дмитрием Ивановичем, доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией

структурной биохимии белка, указала, что диссертация Холявка М.Г. 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 24.09.2013 № 842 (ред. от 28.08.2017), предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Соискатель имеет более 200 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 85 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 38 работ. Все работы посвящены изучению и характеристике физико-химических, структурно-функциональных свойств инулиназ и закономерностей формирования ими надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения. Авторский вклад составляет 90 %. Общий объем – 30 п.л.

Наиболее значимые научные работы:

1. Холявка М.Г. Инулиназы в условиях различного микроокружения: биофизические, кинетические и структурно-функциональные свойства / М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2018. – 288с.
2. Development of heterogeneous preparation with inulinase for tubular reactor systems / M.G. Holyavka [et al.] // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2016. - Vol. 129 – P. 1-5.
3. In silico design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase / M.G. Holyavka [et al.] // Computers in biology and medicine. – 2016. – Vol. 71. –P. 198-204.

На диссертацию и автореферат поступило 9 отзывов от: 1) в.н.с. ФГБУН Институт катализа СО РАН, д.х.н., проф. Коваленко Г.А.; 2) зав. каф. биотехнологии, биоинженерии и биохимии Факультета биотехнологии и биологии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», д.б.н., проф. Ревина В.В. и проф. той же каф. Кадималиева Д.А.; 3) в.н.с. Лаб. структуры и динамики биомолекулярных систем ФГБУН Института биофизики клетки РАН, д.б.н. Дегтяревой О.В.; 4) в.н.с. Лаб. микробиологии и биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН», д.б.н. Максимовой Ю.Г.; 5) г.н.с. Академии биологии и биотехнологии ЮФУ, д.б.н., проф. Узденского А.Б.; 6) г.н.с. Научно-исследовательской лаб. Бионанотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии КФУ, д.б.н., Фахруллина Р.Ф.; 7) проф. каф. «Физика» СевГУ, д.ф.-м.н.,

Костюкова В.В.; 8) в.н.с. каф. биофизики биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ», д.ф.-м.н., Коваленко И.Б.; 9) проф. каф. биологии и защиты растений ВГАУ им. Петра I», д.т.н., доц. Соколенко Г.Г.

Все отзывы положительные, замечания носят рекомендательный характер.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией рецензентов по тематике диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- предложен и апробирован комплексный подход для изучения надмолекулярной организации инулиназ в условиях различного микроокружения, заключающийся в сочетании атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния с методами инфракрасной спектроскопии, гель-хроматографии и электрофореза;
- выявлены закономерности образования надмолекулярных комплексов ферментом инулиназой при ее различных концентрациях в растворе, установлено, что энзим функционально активен как в мономерной, так и в других, преимущественно, димерных формах;
- разработан алгоритм для составления быстрых прогнозов относительно пределов колебаний физико-химических и кинетических характеристик молекул инулиназ и экспресс-оценки их динамического состояния;
- выявлены структурно-функциональные особенности инулиназ в условиях различного микроокружения (иммобилизация на полимерных носителях, действие УФ-облучения, варьирование величин рН, температуры, концентрации субстрата);
- изучена роль процессов формирования димеров с измененной пространственной структурой, образования тетрамеров и более крупных ассоциатов, диссоциации молекулы фермента на субъединицы в проявлении функциональной активности инулиназы;
- выполнен виртуальный скрининг лигандов для иммобилизации инулиназы, определены вероятные сайты связывания полимерных матриц с молекулой фермента при адсорбционной иммобилизации, 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, а также модель учета кинетики реакции как инструменты для понимания и прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде;

- оценены генотоксические и цитотоксические свойства препаратов инулиназы, иммобилизованной на различных синтетических носителях (АВ-17-2П, КУ-2, КУ-2-8чС, ВИОН КН-1), показано, что эти сорбенты, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их к использованию в качестве катализаторов для промышленного получения фруктозы из растительного сырья.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- доказаны положения диссертационной работы, вносящие вклад в расширение представлений о роли процессов ассоциации-диссоциации и иммобилизации как возможных механизмов регулирования каталитической активности инулиназ;

- применен комплекс биофизических методов (метод спектрофотометрии в УФ- и видимом диапазоне длин волн, атомно-силовой микроскопии, динамического светорассеяния, инфракрасной спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии), биохимических методов (гель-хроматография, электрофорез), тесты на цито- и генотоксичность, а также методов компьютерного моделирования (методы молекулярного докинга);

- определены условия образования молекулами инулиназы надмолекулярных комплексов при изменении их микроокружения, изучены механизмы стабилизации иммобилизованных инулиназ под действием экстремальных значений рН и температуры, исследованы кинетические аспекты катализа гомогенными и гетерогенными ферментными препаратами;

- методами компьютерного моделирования выполнен виртуальный скрининг лигандов для адсорбции инулиназы, высказаны соображения о механизмах взаимодействия предлагаемых нами матриц для иммобилизации молекул фермента и структурных особенностях таких комплексов;

- в сравнительном аспекте проанализированы пути регулирования каталитической активности инулиназ, дана характеристика гетерогенных препаратов на основе иммобилизованных энзимов, выявлены оптимальные для их функционирования параметры системы;

- с помощью некоторых численных и экспериментальных методов анализа разработана концепция, описывающая типы модуляции надмолекулярной организации инулиназ в условиях различного

микроокружения;

– созданы математические модели учета кинетики реакции гидролиза инулина при различных условиях как инструменты для понимания и прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

– выявление молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы позволило автору оптимизировать методику сорбционной иммобилизации фермента, которая позволяет сохранить до 80 % первоначальной каталитической активности энзима;

– математические модели зависимости активности свободной и иммобилизованной инулиназы от значений температуры, концентрации ионов водорода, концентрации инулина могут служить для прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде при варьировании этих параметров в биореакторе;

– показано, что сорбенты АВ-17-2П, КУ-2, КУ-2-8чС, ВИОН КН-1, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их к использованию в качестве катализаторов для промышленного получения фруктозы из растительного сырья;

– установлено, что иммобилизованные препараты инулиназы проявляют максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов клубней топинамбура, корней цикория и девясила, луковиц георгина, которые являются перспективными для промышленного применения с целью получения фруктозы ферментативным путем.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

– для экспериментальных работ результаты получены на сертифицированном оборудовании, подвергнуты статистической обработке при использовании лицензионных компьютерных программ, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях;

– теория построена на новых данных, согласуется с опубликованными экспериментальными результатами по исследованию физико-химических и структурно-функциональных свойств инулиназ из различных продуцентов;

– идея базируется на анализе полученных данных и практики мирового опыта по изучению путей и условий стабилизации ферментов и направленного изменения их свойств и кинетических характеристик;

– использованы современные методы сбора и математической обработки исходной информации, обоснован подбор объектов исследования;

– основные положения и выводы, сформулированные в диссертации, научно обоснованы и прошли апробацию на научных конференциях различных уровней.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии автора в разработке алгоритма исследований, постановке и проведении лабораторных экспериментов, статистической обработке и интерпретации экспериментальных данных, разработке гипотетических схем, отражающих закономерности образования надмолекулярных комплексов молекулами инулиназ и механизмы их взаимодействия с полимерными нерастворимыми лигандами – кандидатами в иммобилизационные агенты, а также в подготовке и написании научных публикаций, апробации результатов исследований. Материалы диссертации были опубликованы в ведущих научных изданиях из перечня ВАК РФ, Scopus, Web of Science, доложены на всероссийских и международных конференциях.

Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной задачи и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформой, концептуальностью и взаимосвязью выводов.

В диссертации Холявка Марины Геннадьевны соблюдены установленные Положением о порядке присуждения ученых степеней критерии, которым должна соответствовать диссертация на соискание ученой степени доктора наук.

В диссертации Холявка Марины Геннадьевны отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На заседании 26.06.2018 диссертационный совет принял решение присудить Холявка М.Г. ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 7 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 19 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «За» – 14, «Против» – нет, «Недействительных бюллетеней» – нет.

Заместитель председателя
диссертационного совета

Алабовский Владимир Владимирович

Ученый секретарь
диссертационного совета

Грабович Маргарита Юрьевна

26 июня 2018 г.

