

## О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу

**Полякова Александра Викторовича**

«ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА ПАПАИНОМ НА СТРУКТУРУ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕГУМИНОВ»,

представленную на соискание ученой степени

кандидата химических наук по специальностям:

02.00.04 – Физическая химия и 02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

В современном мире роль зернобобовых культур, также содержащихся в них веществ белковой природы, в питании людей и для кормления сельскохозяйственных животных трудно переоценить. Поэтому неудивительно, что, несмотря на многовековую историю использования цивилизациями нашей планеты зернобобовых растений (соя, горох, фасоль, чечевица, кормовые бобы и др.) и продуктов их переработки, накопленный огромный эмпирический, а с развитием науки и исследовательский опыт, интерес к этим объектам не ослабевает ни в прикладном, ни в естественно-научном аспектах. В этом контексте углубление знаний о структуре и свойствах таких важнейших пищевых ингредиентов этих сельскохозяйственных культур, как белки, а также их производных (в частности, модифицированных с помощью физических, химических или биотехнологических приемов белковых веществ), несомненно имеет большое значение. Это, в свою очередь, определяет актуальность и научную значимость исследований подобных интересных (как с научной, так и с практической точек зрения) биополимерных объектов вообще, и, в частности, тех конкретных систем, которым посвящена рецензируемая диссертация А.В.Полякова.

Автором диссертации выполнен большой объем исследований, связанных с получением данных о влиянии ограниченного протеолиза папаином на совокупность физико-химических характеристик модифицированных таким образом 11S глобулинов сои (*Glycine max*) и кормовых бобов (*Vicia faba*) – глицинина и легумина, соответственно. В ходе этих исследований диссертантом применялся широкий набор современных методов физико-химического анализа, в частности, ультрафиолетовая и флуоресцентная спектроскопия, статистическое и динамическое светорассеяние, малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, высокочувствительная сканирующая калориметрия, динамическая капиллярная тензиометрия и двумерная дилатометрия, ультрацентрифугирование, потенциометрия и др. Это в результате позволило получить, часто впервые, большой массив научных данных, что

следует отнести к научной новизне диссертационной работы А.В.Полякова. По своей направленности, объектам исследований и методологии выполненных экспериментов данная диссертация вполне соответствует специальностям «Физическая химия» и «Высокомолекулярные соединения», а также является междисциплинарным исследованием с широким привлечением методологии полимерных дисциплин, физико-химического анализа и, в необходимой мере, биохимии. В этой связи, к очевидным заслугам диссертанта относится овладение указанными методами, по крайней мере, на уровне тех задач, которые стояли перед ним по ходу выполнения работы. В целом автору диссертации в основном удалось успешно справиться с этими задачами и получить интересные научные результаты, которые могут иметь также определенное практическое значение, особенно в плане выработки подходов к совершенствованию приемов ферментативной модификации белоксодержащего сырья пищевого назначения.

Диссертация А.В.Полякова построена по традиционной схеме и включает следующие разделы: введение (где автор формулирует цели и задачи исследования), литературный обзор, экспериментальную часть, обсуждение результатов работы, заключение и выводы, список используемых сокращений, перечень цитируемой литературы. Диссертация изложена на 151 стр., содержит 37 рисунков и 12 таблиц; список цитируемой литературы включает 357 ссылок.

В литературном обзоре диссертант излагает известные из публикаций данные о содержащихся в зернобобовых культурах белковых веществах, главным образом легуминах, их составе, свойствах и структурной организации. Также рассматриваются известные из литературы методы изучения физико-химических характеристик таких белков, их функциональные свойства и подходы к модификации (химические, биохимические, физические и биотехнологические). Поскольку обсуждаемые в литературном обзоре вопросы связаны с экспериментальными исследованиями автора рецензируемой работы, то такая структура данной главы диссертации представляется весьма обоснованной.

В целом литературный обзор несомненно интересен, хотя и недостаточно тщательно, с точки зрения оппонента, отредактирован, т.к. содержит довольно большое число не совсем корректных выражений, опечаток, а также терминологических неточностей. Так, в Таблице 1.1 (стр.13) в графе «Содержание макромолекулярных компонентов и минеральных веществ» помимо белков почему-то приводятся данные и о содержании никак не макромолекулярных углеводов и липидов. На странице 19 имеется утверждение, что «около 50% карбоксильных групп указанных аминокислот (имеется в виду Асп и Глу) находятся в виде амидов» (?), хотя карбоксильные и амидные группы это разные химические структуры. Или «... для глицинина характерно понижение поверхностного натяжения при

увеличении концентрации белка до практически постоянной величины» (стр. 28) – фраза с непонятным физическим смыслом. На стр.30 перекись водорода ошибочно отнесена к перечню веществ, блокирующих образование межмолекулярных дисульфидных связей, а на стр.34 конформация полипептидных цепей неверно названа конфигурацией. Также в этой части диссертации встречаются опечатки и неточная пунктуация.

В литературном обзоре, не смотря на его существенный объем, хотелось бы видеть больше информации относительно анализа диссертантом излагаемого материала, а также – какие выводы можно сделать на основе рассматриваемых фактов, а не просто изложение набора данных из работ, опубликованных другими исследователями. Кроме того, разделы «экономической» направленности вполне можно было бы заменить более детальным рассмотрением химической структуры легуминов и ее взаимосвязи с комплексом физико-химических свойств этих белков, а также их модифицированных производных.

Экспериментальная часть диссертационной работы А.В.Полякова содержит описание использованных веществ, методик проведения экспериментов и анализа полученных препаратов. В основном этот раздел изложен логично и профессионально, хотя и содержит некоторые «вкрапления» лабораторного сленга. К несомненным достоинствам использованных автором экспериментальных подходов относится широкое и квалифицированное применение различных современных аналитических методик, а также информативных методов физико-химических исследований.

В качестве основного замечания к этой части диссертации следует отметить сомнения рецензента в отношении правомерности использования азидата натрия (в концентрации примерно 3 ммоль/л) в составе растворителя, применявшегося на стадии обработки нативных белков папаином. Присутствие столько реакционного вещества, способного «портить» ферменты (например, реагируя с остатками метионина в белках, - см. Ю.М.Торчинский «Сера в белках»), несомненно требовало бы контрольных экспериментов по протеолизу тех же субстратов, но в среде без добавок азидата, чтобы убедиться в отсутствии нежелательных эффектов.

Основная часть диссертации А.В.Полякова (результаты и их обсуждение) включает две основные части, посвященные, соответственно, (а) исследованиям влияния ограниченного протеолиза на совокупность физико-химических свойств глицинина сои и легумина кормовых бобов, т.е. выяснению последствий такой ферментативной модификации данных белков для их структуры и свойств, и (б) изучению функциональных характеристик (пенообразующая способность, атакуемость ферментами желудочно-пищеварительного тракта).

Важной особенностью этой части работы является систематическое, подробное и тщательное исследование изменений молекулярной структуры изучаемых белков в результате биохимической (ферментативной) модификации и влияния этих изменений на термодинамическое сродство полимера к растворителю, поверхностный заряд белковых наночастиц, конформационную стабильность макромолекул, энергетику образования адсорбционных слоев на границах раздела фаз воздух/жидкость, атакуемость модифицированных белков пищеварительными ферментами, способность модифицированных легумина и глицинина стабилизировать пены.

В основном эта глава диссертации оставляет благоприятное впечатление как в отношении объема выполненных диссертантом экспериментов, так и научного уровня обсуждения полученных результатов. В этой связи некоторые досадные огрехи стиля изложения и неточности в определенной мере мешают «усвоению» текста. В частности, автор работы много раз использует словосочетание «свободна энергия денатурации Гиббса», что у читателя вызывает вопрос о том, каким образом денатурации подвергается или подвергался столь известный ученый? На стр. 79 аминокислотные остатки в составе белковых цепей почему-то описываются как просто аминокислоты, т.е. изолированные низкомолекулярные вещества. На стр. 90 читаем: «... понижение конформационной стабильности ... обусловлено глубокой перестройкой внутримолекулярных связей ...» - поскольку у автора диссертации нет указания на их тип, а внутримолекулярными связями в белках являются и ковалентные связи, и нековалентные контакты, то обсуждаемая фраза может пониматься как относящаяся к любым типам, хотя ковалентные связи тут ни при чем. Формула 3.12 (стр. 98) не описывает скорость адсорбции, в то время как это утверждается в предваряющем ее абзаце. Раздел 3.3.3 (стр. 101): «Это позволяет проследить связь между реологическими свойствами адсорбционных слоев и их пенообразующей и эмульгирующей способностью» (?) – сами по себе адсорбционные слои не могут обладать указанными способностями. Подобные примеры можно было бы приводить еще.

Что же касается качества полученных А.В.Поляковым экспериментальных результатов, то их надежность не вызывает вопросов, а объем выполненных исследований может быть охарактеризован как очень значительный. Единственные данные, которых явно недостает в этой работе, это сведения об аминокислотном составе модифицированных белков и сравнение с аминокислотным составом интактных глицинина сои и легумина кормовых бобов. Также, и это скорее пожелание для дальнейших исследований, было бы интересно провести сравнительное изучение свойств этих же интактных и модифицированных белковых веществ с помощью современных методов ядерного магнит-

ного резонанса, используемых в настоящее время при исследовании молекулярной динамики функционирования ферментов.

Подводя итог анализа диссертационной работы А.В.Полякова в целом, необходимо отметить, что сделанные замечание в основном касаются частностей, а сама работа «ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА ПАПАИНОМ НА СТРУКТУРУ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕГУМИНОВ», представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, выполнена на хорошем современном уровне и по актуальности поставленных задач, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 с изменениями, утвержденными постановлением Правительства «О внесении изменений в положение о присуждении ученых степеней» РФ № 335 от 21.04.2016.

Материалы диссертации прошли апробацию на международных конференциях, опубликованы 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК. Считаю, что автор диссертации Поляков Александр Викторович заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.04 – «Физическая химия» и 02.00.06 – «Высокомолекулярные соединения».

Официальный оппонент

Лозинский Владимир Иосифович



Адрес: 119991 Российская Федерация, г.Москва, ул.Вавилова, д.28

Тел.: 8(499)1356492, факс: 8(499)1355085; e-mail: [loz@ineos.ac.ru](mailto:loz@ineos.ac.ru)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук

Заведующий Лабораторией криохимии (био)полимеров

доктор химических наук, профессор

27.02.2017

Подпись д.х.н., профессора В.И.Лозинского заверяю.

Ученый секретарь

ФГБУ науки «Институт элементоорганической химии им. А.Н. Несмеянова» РАН

д.х.н.

Тел.: 8(499)1356165, e-mail: [larina@ineos.ac.ru](mailto:larina@ineos.ac.ru)

Дата



С.Е.Любимов

