

ОТЗЫВ

официального оппонента д.ф.-м.н. Потехина Сергея Александровича
на диссертацию 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

Диссертационная работа Полякова А.В. посвящена изучению эффекта ограниченного протеолиза легуминов (11S фракции глобулинов запасных белков семян зернобобовых культур) под действием папаина на их структуру, термодинамические свойства в объеме раствора и на границе воздух/раствор, динамику формирования и реологические свойства адсорбционных слоев, а также некоторые другие свойства полезные с точки зрения пищевой промышленности. Актуальность выбранного направления определяется потребностью в диверсификации сырьевой базы и снижении себестоимости источников пищевого белка, как основного нутриента и структурообразующего компонента пищевых систем. Белки зернобобовых культур обладают большим потенциалом для увеличения их применения в пищевых целях, однако, их использование сопряжено с рядом проблем, обусловленных особенностями структуры, таких как низкая атакуемость ферментами желудочно-кишечного тракта, высокая иммунореактивность и т.д. Известно, что ферментативная модификация в определенных случаях может способствовать устранению названных проблем.

Диссертационная работа Полякова А.В. организована по классической схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, состоящие из четырех разделов, заключение, выводы, а также список цитируемой литературы (всего 367 источников).

Во **введении** убедительно обоснована актуальность проблемы белкового дефицита в питании населения, приводящая к возникновению алиментарнозависимых заболеваний, и существующие подходы к ее решению. Одним из приоритетных научных направлений в данной области признано создание научных основ технологии новых ингредиентов с высокими функциональными свойствами для обогащения традиционных пищевых продуктов, а также создания продуктов лечебного и функционального питания на их основе. При этом белки могут выполнять функции как основных нутриентов, так и

структурообразователей в составе белоксодержащих композиций. Растительные белки и, в частности, запасные белки семян зернобобовых и масличных культур по доступности и аминокислотному составу могут служить ценными компонентами пищевых систем, однако до настоящего времени используются в этом качестве крайне ограниченно.

Здесь же охарактеризованы научная новизна, практическая и теоретическая значимость полученных результатов, личный вклад автора, информацию об апробации диссертации, ее структуре и объеме.

Глава 1 **Обзор литературы**, в котором подробно изложены современные представления о фракционном составе, функциях, антиалиментарных факторах и структуре запасных белков зернобобовых культур; их физико-химических свойствах, ключевых с точки зрения функциональности (конформационной стабильности и поверхностной активности), функциональных свойствах и сравнительной характеристике различных способов их регулирования. Особое внимание уделено влиянию ограниченного протеолиза на свойства легуминов в зависимости от природы протеазы и условий модификации. На основании анализа литературных данных были сделаны следующие выводы: 1) структура легуминов многих зернобобовых и масличных культур гомологична на всех уровнях организации; 2) ограниченный протеолиз легуминов протекает по единому механизму, заключающемуся в отщеплении на первом этапе слабоупорядоченных фрагментов α -цепей; 3) ограниченный протеолиз легуминов под действием папаина обладает наибольшим потенциалом для улучшения функциональных свойств легуминов, однако фундаментальные закономерности, устанавливающие взаимосвязь структура - физико-химическое свойство - функциональное свойство не установлены, что не позволяет прогнозировать изменение свойств. Соответственно, были сформулированы цель и задачи исследования:

Цель работы заключалась в установлении связи между изменением структуры легуминов сои (глицинин) и кормовых бобов (легумин *V.f.*) в результате ограниченного протеолиза папаином и изменением их физико-химических и функциональных свойств.

Для достижения поставленной цели было необходимо провести сравнительное исследование следующих характеристик интактных и модифицированных легуминов:

- 1) молекулярных параметров в растворе (молекулярной массы, поверхностного заряда, термодинамического сродства к растворителю, гидродинамических параметров);
- 2) конформационной стабильности;
- 3) поверхностной активности на границе воздух/раствор, динамики формирования и реологических свойства адсорбционных слоев;
- 4) функциональных свойств (атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта *in vitro*, пенообразующей способности).

В главе 2 **Материалы и методы исследования** подробно описаны методы и условия выделения интактных легуминов и их модификации ограниченным протеолизом папином. Приведено краткое описание принципа действия и наименование используемого оборудования (14 инструментальных методов), условия приготовления образцов и проведения экспериментов.

Глава 3 **Результаты исследований и их обсуждение** содержит четыре раздела, посвященных сравнительному исследованию: 3.1. молекулярных параметров; 3.2. термодинамической стабильности; 3.3. поверхностной активности и свойств адсорбционных слоев; 3.4. функциональных свойств (пенообразующей способности, атакуемости ферментами ЖКТ) интактных и модифицированных легуминов. Разделы логически связаны, в работе систематически подчеркивается связь между изменением структурных параметров и исследуемых свойств.

Сочетанием методов статического и динамического светорассеяния количественно охарактеризовано понижение основных молекулярных параметров легуминов в результате протеолиза, таких как молекулярная масса, гидродинамический и инерционные размеры, величины ξ -потенциалов, константы седиментации и другие. Комбинацией полученных параметров установлены изменения формы молекул и их взаимодействие с растворителем.

Сочетанием методов статического светорассеяния и флуоресцентной спектроскопии установлено понижение термодинамического сродства легуминов к растворителю за счет экспонирования дополнительного числа гидрофобных групп включая ароматические (понижение величины второго вириального коэффициента, понижение интенсивности флуоресценции и «красный сдвиг» максимума).

Раздел 3.2. посвящен изучению конформационной стабильности легуминов методом ВЧ-ДСК. Определены термодинамические параметры тепловой денатурации интактных и модифицированных легуминов как функция ионной силы. Обоснована применимость к анализу термограмм подхода с позиций равновесной термодинамики. Это позволило оценить степень кооперативности процесса денатурации, а также свободную энергию денатурации Гиббса при различных температурах. Рассчитаны температурные зависимости свободной энергии денатурации как функции ионной силы, свидетельствующие о подобном характере повышения конформационной стабильности интактных и модифицированных легуминов во всем исследованном диапазоне ионных сил. В то же время показано, что конформационная стабильность легуминов понижается в результате ограниченного протеолиза.

Раздел 3.3 посвящен исследованию поверхностного поведения интактных и модифицированных легуминов методами динамической тензиометрии и двумерной дилатометрии. Установлено повышение скорости адсорбции, увеличение максимального поверхностного давления, понижение концентрации формирования насыщенного адсорбционного слоя и увеличение комплексного модуля упругости адсорбционных слоев в результате модификации. Продемонстрирована четкая связь между изменением молекулярных параметров легуминов и характеристиками их адсорбционного поведения.

В целом, анализ результатов, представленных в разделах 3.1-3.3, показывает, что установлена тесная взаимосвязь между изменениями структуры легуминов и изменением физико-химических свойств в результате модификации. Важно отметить, что эти изменения позволяют прогнозировать повышение потребительских свойств легуминов.

Приведенные в разделе 3.4 результаты определения пенообразующей способности интактных и модифицированных легуминов подтверждают прогнозируемый эффект: значительно возрастает объем и стабильность пен, обусловленные повышением поверхностной активности, скорости адсорбции и реологических свойств формируемых в процессе эмульгирования адсорбционных слоев. Повышение атакуемости легуминов ферментами желудочно-кишечного тракта связано с дестабилизацией структуры легуминов, обеспечивающей доступность дополнительных пептидных связей действию папаина.

При прочтении диссертации возникает ряд замечаний и вопросов, в частности связанных с использованием терминологии.

Иногда в работе необоснованно используются англицизмы, например, термин “эссенциальный”, “пенетрация” и т.д. Непонятна необходимость введения этих новых терминов. Не всегда понятно, какой смысл (в дополнение к обычному русскому синониму) автор придает этим терминам в контексте диссертации.

Использование некоторых терминов может вызывать определенный протест у биологов. Например, термин “функциональный”. Хотя в контексте диссертационной работы и понятно, о чем идет речь, но, продолжая логику автора, можно признать, например, что основная функция печени животных – удовлетворять потребности человека во вкусной пище.

Под гомологией вторичной структуры обычно предполагают нечто большее, чем одинаковое содержание элементов вторичной структуры, как это делает автор (стр. 19).

Не понятно, что подразумевает автор, говоря о ”высоко коррелированных взаимодействиях аминокислотных остатков” (стр. 25).

Что означает термин “разрыхление структуры” (стр. 81) в физическом плане?

Имеются некоторые замечания к оформлению диссертации.

В таблице 1.5. не указаны условия, при которых получены данные.

В материалах и методах не указано, в течение какого времени использовались растворы содержащие β - меркаптоэтанол. Это важно, так как если не предпринимать никаких дополнительных действий, уже через несколько часов свободных SH групп в растворе не останется.

Не указаны белки - маркеры молекулярных весов, использованные при электрофорезе.

В ссылке 121 неправильно указан журнал. Вместо “Agric. Biol. Chem” указан “Food Nutr.”.

Часть таблицы 3.4 перенесена на другую страницу без обозначения колонок. Смотреть такую таблицу не удобно.

Приводить результаты в секундах, когда время порядка суток, не очень то удобно (стр. 57, 91).

Во многих случаях измеренные параметры приводятся с превышением реальной точности.

Ошибки указываются с точностью до второго знака, хотя набранная статистика вряд ли позволяет это сделать.

Несколько замечаний по содержанию диссертации.

На стр. 90 утверждается, что ограниченный протеолиз “ вызывает понижение как свободной энергии денатурации глицинина и легумина *V.f.*, так и уровня кооперативности конформационного перехода”. Откуда следует, что понижается уровень кооперативности.

На стр. 82 написано, что близость наклона Δc_p величинам инкрементов теплоемкости $\Delta_d c_p$, экспериментально установленным из термограмм соответствующих легуминов является признаком термодинамического соответствия полученных калориметрических данных. Что понимается под “термодинамическим соответствием”? На сколько я понимаю, из вышеупомянутого факта следует независимость энтальпии денатурации от содержания соли.

Ссылка на закон Кирхгоффа (стр. 85) строго говоря, не очень корректна, так как все точки представленные на графике получены при разных условиях (разные ионные силы раствора). Закон Кирхгоффа связывает производную зависимости энтальпии перехода по температуре со скачком теплоемкости при **неизменных** условиях.

На стр. 88 автор пишет, что “предварительная деконволюция пиков избыточной теплоемкости на основе выбранной модели показала наличие 3-х пиков теплопоглощения, при которой наблюдалось наименьшее среднеквадратичное отклонение ...” Исходя из общих соображений, это не может быть правильным. Чем больше переходов (параметров) будет использовано в модели, тем точнее будет описание кривой!

На той же странице, “по аналогии можно полагать, что низкотемпературный переход обусловлен диссоциацией макромолекул легуминов на субъединицы, а два последующих высокотемпературных перехода вызваны отдельной денатурацией доменов...” Предполагать, конечно, можно, но нельзя считать это доказанным. Тем более, что доказательств нет и в приведенной ссылке. Сомнения усиливают и результаты разложения (таблица 3.5). Не очень понятно, каким образом увеличение ионной силы способно увеличить энтальпию отдельного перехода в 2.4 раза?

На стр. 41 и 96 автор пишет, что “в процессе ограниченного протеолиза происходит разрушение дисульфидных связей внутри молекулы белка”. Насколько я знаю, способности восстанавливать SS связи у папаина не обнаружено.

На стр. 70 по результатам светорассеяния приводятся распределения молекул по радиусам Стокса как для белков исходных, так и для обработанного папаином. Что может быть причиной столь широкого распределения для нативной молекулы белка?

Тем не менее, указанные замечания не имеют принципиальный характер и не уменьшают значимость работы.

В заключение можно отметить, что в диссертационной работе Полякова А.В. проведено комплексное систематическое исследование с применением широкого набора современных физико-химических методов. Автореферат полностью раскрывает основные положения диссертации. Основные результаты для модифицированных белков получены впервые, данные по интактным белкам не противоречат известным из литературы. Установленные закономерности влияния параметров молекулярной структуры как интактных, так и модифицированных легуминов на их конформационную стабильность и адсорбционное поведение имеют фундаментальный характер. Практическая значимость результатов работы несомненна.

Диссертационная работа Полякова Александра Викторовича «Влияние ограниченного протеолиза папаином на структуру, физико-химические и функциональные свойства легуминов» представляет собой законченное научно-квалификационное исследование. Основные результаты, полученные в ходе выполнения работы, опубликованы. Данная диссертация отвечает требованиям 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. Диссертант Поляков Александр Викторович заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.04 – «Физическая химия» и 02.00.06 – «Высокомолекулярные соединения».

«27» февраля 2017 года

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник, руководитель группы термодинамики белка
Института белка РАН, доктор физико-математических наук



Потехин Сергей Александрович

Подпись заверяю

Главный ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка
Российской академии наук (ИБ РАН)

Почтовый адрес: 142290 Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 4

Телефон: 8(4967)31-84-54

e-mail: spot@vega.protres.ru



Собственноручная подпись
Тов. Потехина С.А.
удостоверяется
Подпись
27.02.2017