

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 99.0.027.03,  
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ РОССИЙСКОГО ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ТВЕРСКОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА МИНИСТЕРСТВА  
НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ,  
ИНСТИТУТА БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМЕНИ  
Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,  
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело  
№

решение диссертационного  
совета  
от «30» мая 2023 года № 8

О присуждении Стадольниковой Полине Юрьевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Разработка и исследование свойств нового биокатализатора на основе альгинатных микросфер и глюкозооксидазы» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите «28» марта 2023 года (протокол заседания №6) диссертационным советом 99.0.027.03, созданным на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной технической университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук (125047, Москва, Миусская площадь, 9, приказ о создании диссертационного совета от «28» сентября 2016 года №1172/нк).

Соискатель Стадольникова Полина Юрьевна, «24» сентября 1993 года рождения. В 2017 году окончила Тверской государственной технической университет. В 2022 году освоила программу подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре Тверского государственного технического университета. Работает преподавателем кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Тверского государственного технического университета Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Диссертация выполнена на кафедре биотехнологии, химии и стандартизации Тверского государственного технического университета Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель – кандидат химических наук Тихонов Борис Борисович, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Тверского государственного технического университета.

Официальные оппоненты:

Лозинский Владимир Павлович, доктор химических наук, заведующий лабораторией криохимии биополимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова» Российской академии наук;

Шнайдер Ксения Леонидовна, кандидат химических наук, доцент кафедры пищевой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет»,

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановский государственный химико-технологический университет» (Иваново) в своем *положительном* отзыве, подписанном Макаровым Сергеем Васильевичем, доктором химических наук, профессором, заведующим кафедрой технологии пищевых продуктов и биотехнологии, указала, что по объему выполненных исследований, научному и методическому уровню их проведения, актуальности, новизне, значимости для науки и практики полученных результатов диссертационная работа «Разработка и исследование свойств нового биокатализатора на основе альгинатных микросфер и глюкозооксидазы», представленная на официальное оппонирование, полностью удовлетворяет требованиям пп 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в редакции от 26.09.2022), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а ее автор – Стадольникова Полина Юрьевна – заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (отзыв обсужден и утвержден на заседании кафедры технологии пищевых продуктов и биотехнологии «25» апреля 2023 года, протокол № 10).

Соискатель имеет 19 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 19 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 8 работ. Общий объем публикаций составляет 88 страниц. *В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах.* 19 работ опубликовано с соавторами. Личный вклад в работы, опубликованные в соавторстве, составляет не менее 80 %, и состоит в разработке концепции исследования, постановке задач, выполнении исследований и интерпретации полученных результатов. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на 8 международных и всероссийских научных конференциях и форумах; монографий и депонированных рукописей соискатель не имеет.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Stadolnikova, P. Yu.** Immobilization of glucose oxidase on sodium alginate microspheres / P. Yu. Stadolnikova, B. E. Tikhonov, E. A. Prutenskaya, A. I. Sidorov, M. G. Sulman // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2023. – Vol. 59, №1. – P. 68–75 (Scopus, Web of Science).

2. Matveeva, V.G. Water treatment from phenol derivatives by the oxidoreductases immobilized on alginate microspheres / V.G. Matveeva, B.B. Tikhonov, P.Y. Stadolnikova, A.I. Sidorov, O.V. Grebennikova, E.M. Sulman, V.I. Panfilov // Chemical Engineering Transactions. - 2020. – Vol. 81. - P. 787-792 (Scopus).

3. Tikhonov, E.B. Immobilized enzymes from the class of oxidoreductases in technological processes: a review / E.B. Tikhonov, E.M. Sulman, P.Y. Stadol'nikova, A.M. Sulman, E.P. Gelikova, A.I. Sidoren, V.G. Matveeva // *Catalysis in Industry*. - 2019. - Vol. 11, № 3. - P. 251-263 (Scopus, Web of Science).

На диссертацию и автореферат поступило 8 отзывов, *все положительные*. В отзывах указывается, что представленная к защите диссертационная работа характеризуется высокой актуальностью, научной ценностью и имеет большое значение для теории и практики биотехнологической отрасли промышленности Российской Федерации. Отзывы направляли:

1. Дворецкий Дмитрий Станиславович, доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тамбовский государственный технический университет», и Темнов Михаил Сергеевич, кандидат технических наук, доцент той же кафедры. В отзыве указаны следующие замечания: (1) из текста автореферата непонятно, почему стабильные микросферы в размерном диапазоне до 200 мкм наиболее подходящие для дальнейшей иммобилизации фермента? (2) из текста автореферата непонятно, до какой остаточной влажности необходимо высушить биокатализатор для эффективного хранения при температуре +2...+4 °С?

2. Понаморева Ольга Николаевна, доктор химических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тульский государственный университет». В отзыве приведены следующие замечания и вопросы: (1) диссертанту следовало бы объяснить механизм формирования равномерного пула микрочастиц альгинатного гидрогеля в предложенных условиях (эмульсия вода/подсолнечное масло, два разных сурфактанта на разных стадиях формирования микрочастиц); (2) в автореферате не описан механизм улучшения качества хлебобулочных изделий, поэтому сложно оценить роль глюкозооксидазы, альгинатных микросфер или их сочетания в этом процессе; (3) выводы слишком длинные и снова включают информацию о проделанной работе, полученных результатах, а не только конечный анализ выполненной работы.

3. Евдокимов Иван Алексеевич, доктор технических наук, профессор, заведующий базовой кафедрой технологии молока и молочных продуктов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Кавказский Федеральный университет», и Лодыгин Алексей Дмитриевич, доктор технических наук, заведующий кафедрой прикладной биотехнологии того же университета. В качестве замечания указано, что целесообразно было представить принципиальную технологическую схему получения биокатализатора imGOx.

4. Корнеева Ольга Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий». В отзыве написаны следующие замечания: (1) На рис. 7 представлены данные по изменению концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различных начальных концентрациях D-глюкозы для GOx и imGOx, по которым автором были рассчитаны

кинетические параметры GOx и imGOx (активность  $A$ , предельная скорость реакции  $V_m$  и константа Михаэлиса  $K_M$ ), представленные в табл.2. К сожалению, автором не представлена зависимость скорости реакции от концентрации субстратов, которая, как правило, используется для расчета данных величин, тем более, что, как видно из рис.7 (б), при начальной концентрации D-глюкозы для imGOx, равной 22,0 мМ, содержание образующегося  $H_2O_2$  не достигает максимальной величины. (2) Автор пишет о безопасности входящей в состав imGOx глюкозооксидазы из *Aspergillus niger*, однако среди грибов вида *A. niger* могут быть и условно-патогенные штаммы, поэтому целесообразно указать конкретный штамм продуцента глюкозооксидазы и документ, разрешающий применять именно эту добавку в производстве хлебобулочных изделий. (3) Автором проведена пробная выпечка традиционного белого хлеба с использованием синтезированного биокатализатора в качестве добавки к тесту, отмечена целесообразность её использования, однако экономическое обоснование этому не приведено.

5. Дышлюк Любовь Сергеевна, доктор технических наук, профессор кафедры пищевой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Калининградский государственный технический университет». В отзыве имеются следующие вопросы и комментарии: (1) На стр. 3 автореферата автор ставит одной из задач исследования определение оптимальных условий синтеза альгинатных микроферментов методом ЭВГ. Возникает вопрос - каким образом осуществлялась оптимизация? (2) На стр. 12-13 автореферата диссертант делает вывод о безопасности разработанного биокатализатора на основе известных данных о безопасности входящих в его состав компонентов. Проводились ли экспериментальные исследования по изучению токсичности разработанного гетерогенного биокатализатора в связи с потенциальной возможностью его использования в пищевой промышленности? (3) Подтверждена ли соискателем экспериментально возможность повторного использования разработанного биокатализатора?

6. Заварухин Сергей Григорьевич, кандидат технических наук, научный сотрудник Инжинирингового центра Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук». В отзыве имеются следующие замечания: (1) на рис. 7 б) не указана концентрация imGOx; (2) при описании кинетических экспериментов не приведена информация о кислороде. Он находится в избытке? (3) Не описан метод расчета кинетических параметров  $A$ ,  $K_M$  и  $V_m$  по экспериментальным данным; (4) в подписи к рис. 8 неполно указаны условия, при которых получены данные. Для рис. 8 а) не указана температура, а для рис. 8 б) – pH; (5) в автореферате не приведены данные о сравнении влияния нативного фермента GOx и гетерогенного катализатора imGOx при выпечке хлеба; (6) предложенный гетерогенный катализатор протестирован в процессе выпечки хлеба. Желательно бы его протестировать в процессе, в котором проявляются преимущества гетерогенного катализатора – возможность его извлечения и повторного использования; (7) для данных на рис. 9 не приведена скорость нагрева.

7. Степанов Александр Евгеньевич, доктор химических наук, профессор кафедры Общей химической технологии Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова Федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет». В качестве замечаний отмечается, что в автореферате не отражено, каким образом контролировалась полнота отмывки биокатализатора от раствора агентов, активирующих карбоксильные группы биополимерной матрицы, и, кроме того, подробно не была освещена прочность ковалентной пришивки фермента к поверхности альгинатных микросфер.

8. Сорокина Ксения Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук». В отзыве замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что они являются признанными специалистами в данной области биотехнологии, что подтверждается наличием соответствующих публикаций в ведущих научных рецензируемых изданиях, а также спецификой и профилем диссертационной работы, и выполнен в соответствии с пп. 22 и 24 «Положения о присуждении научных степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 в действующей редакции).

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:** теоретически обоснован выбор альгинатных микросфер в качестве эффективного носителя для иммобилизации глюкозооксидазы; разработана методика синтеза альгинатных микросфер методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования; экспериментально определены условия и состав компонентов, обеспечивающие наиболее эффективный синтез микрочастиц с заданными характеристиками; синтезирован новый гетерогенный биокатализатор на основе глюкозооксидазы посредством ее ковалентной иммобилизации на поверхности альгинатных микросфер, полученных методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования; проведена оценка эффективности использования синтезированного биокатализатора в хлебопечении в качестве технологической добавки.

**Теоретическая значимость исследований обоснована тем, что:** впервые теоретически обоснована и экспериментально подтверждена целесообразность физико-химической модификации альгинатных микросфер, полученных методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования, с целью получения носителей, способных к ковалентной сшивке с ферментами; проведена ковалентная пришивка глюкозооксидазы к поверхности альгинатных микросфер; определена активность синтезированного биокатализатора в реакции окисления глюкозооксидазой  $\beta$ -D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

**Значение полученных соискателем результатов исследований для практики подтверждается тем, что:** разработана методика получения гетерогенного биокатализатора на основе глюкозооксидазы, ковалентно иммобилизованной на поверхности альгинатных микросфер посредством активации карбоксильных групп на поверхности биополимера; изучено влияние способа и условий синтеза и хранения разработанного ковалентно иммобилизованного фермента на его активность и стабильность; изучена возможность использования синтезированного биокатализатора для улучшения хлебопекарных свойств теста из пшеничной муки. Полученные результаты позволяют использовать разработанный

биокатализатор в различных сферах, в том числе для определения концентрации D-глюкозы в биологических жидкостях, для получения D-глюконовой кислоты, а также в пищевой промышленности.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

- результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях;
- теория построена на фундаментальных законах, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;
- достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных методов эксперимента, соответствующих современному научному уровню;
- выводы диссертации обоснованы, не вызывают сомнения и согласуются с современными подходами к выбору объектов и методов.

**Личный вклад соискателя** состоит во включенном участии на всех этапах процесса: постановке цели и соответствующих задач исследования, поиске и анализе научной литературы по тематике исследования, проведения всех экспериментов и получении исходных данных, обработке и анализе экспериментальных данных, подготовке основных публикаций по выполненной работе.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Изучалась ли стабильность биокатализатора при хранении? Стабильность различают еще операционную и функциональную, какую стабильность Вы здесь сравнивали и рассматривали?
2. Пытались ли Вы хранить биокатализатор при комнатной температуре?
3. Что подразумевается под величиной, именуемой предельной скоростью реакции? Предельная скорость реакции в данной работе – это и есть  $V_{max}$ ?
4. Почему не была рассчитана каталитическая константа?
5. Не могли бы Вы объяснить, зачем была использована иммобилизация в хлебопечении? Почему выбрано именно хлебопечение?
6. Почему в методике получения частиц не был использован перевод карбоната в гидрокарбонат? Почему изучалось только влияние концентрации альгината на распределение размеров получаемых частиц, а не влияние концентрации хлорида кальция на этапе осаждения?

Соискатель П.Ю. Стадольникова ответила на заданные ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию.

**На первый вопрос** автор пояснила, что была определена остаточная активность иммобилизованного биокатализатора по истечению одного месяца хранения и второго месяца хранения тремя способами: в сухом виде, в буферном растворе и в лиофилизированном виде. В работе рассматривалась операционная стабильность.

**На второй вопрос** автор ответила, что биокатализатор в разных формах хранили только при заявленных в диссертации температурах (+2...+4°C и при -18°C).

**На третий вопрос** автор уточнила, что предельная скорость реакции и максимальная скорость реакции – это одна и та же величина.

На четвертый вопрос автор обозначила, что были рассчитаны те основные параметры, которые наиболее очевидно описывают работу синтезированного биокатализатора: активность, константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции.

На пятый вопрос автор описала, что сфера хлебопечения была выбрана в целях демонстрации возможности применения синтезированной системы именно в прикладном биотехнологическом процессе. Использование ферментов в растворимой форме связано с их меньшим временем активности в массе теста, в то время как иммобилизованная на альгинатных микросферах глюкозооксидаза обладает большей устойчивостью к инактивирующим факторам, что удлиняет время работы биокатализатора, позволяя ему дольше и выраженнее оказывать благоприятное воздействие на клейковину. Процесс улучшения хлебопекарных свойств теста с помощью ферментов представляет определенный интерес в прикладной сфере.

На шестой вопрос автор объяснила, что, согласно литературным данным, в методике эмульгирования/внутреннего гелеобразования используется именно карбонат кальция для осуществления ионотропной сшивки. Также на основании литературных данных основным параметром, который варьируется при синтезе альгинатных микросфер, является именно концентрация гелеобразующего полимера. Количественное соотношение гелеобразующих ионов  $\text{Ca}^{2+}$ /альгинат и ледяная уксусная кислота/ $\text{Ca}^{2+}$  изучалось в работах ранее, и оно не оказывает никакого влияния на размер частиц. Добавочная процедура осаждения микросфер из масляной фазы с помощью хлорида кальция оказывает незначительное влияние на диаметр микросфер, поэтому в данной диссертационной работе влияние данного фактора не рассматривалось. Дальнейшая промывка частиц осуществляется с помощью воды.

На заседании «30» мая 2023 года диссертационный совет принял решение за решение научной задачи по изучению по разработке и изучению свойств нового биокатализатора на основе альгинатных микросфер и глюкозооксидазы, имеющей существенное значение для развития биотехнологии, присудить Стадольниковой Полине Юрьевне ученую степень кандидата химических наук.

Диссертация соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции). По своему содержанию диссертация отвечает направлению специальности 1.5.6. Биотехнология по направлению исследования «Разработка новых технологических процессов на основе микробиологического синтеза, биотрансформации, биокатализа, иммуносорбции, биодеструкции, биоокисления и создание систем биокompостирирования различных отходов, очистки техногенных отходов (сточных вод, газовых выбросов и др.), создание замкнутых технологических схем микробиологического производства, последние с учетом вопросов по охране окружающей среды». Результаты работы могут быть рекомендованы для изучения и внедрения в научных и образовательных организациях, а также на предприятиях пищевой и химической промышленности.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 16 докторов наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17 (семнадцать), против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета

Виктор Иванович Панфилов

Ученый секретарь диссертационного совета

Ирина Васильевна Шакир

30.05.2023

