

официального оппонента Гамаюровой Валентины Семеновны на диссертационную работу Голиковой Екатерины Павловны на тему: «Синтез стабильных биокатализаторов на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганические носители», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность проблемы

Перспективы развития биотехнологии в значительной мере определяются уровнем развития ферментативного катализа. Во всем мире эта область интенсивно развивается, как в направлении создания новых ферментных препаратов, их модификации, иммобилизации, так и расширения областей технологического применения ферментов, в том числе и замены химических катализаторов. Преимущества ферментативного катализа не оспоримы и за рубежом продукцию, которую получают с использованием ферментов, часто называют «зеленой» продукцией, т.к. в ней практически отсутствуют побочные продукты, что определяет высокий спрос на нее.

Объектом исследования в настоящей работе является фермент глюкозооксидаза, который широко используется в пищевой промышленности и как аналитическое средство в клинической химии. Автор решает проблему повышения стабильности глюкозооксидазы иммобилизацией на неорганических носителях, в том числе и с использованием магнитных наночастиц (МНЧ), что позволяет получить магнитоотделяемые биокатализаторы.

Решение проблем повышения стабильности и активности ферментных препаратов, получение новых типов гетерогенных биокатализаторов, в том числе магнитоотделяемых, является **актуальной** проблемой биотехнологии.

Научная новизна и практическая значимость работы

Создан новый тип гетерогенных каталитических систем глюкозооксидазы, иммобилизованной ковалентными связями с модифицированными наночастицами магнетита, которые являются магнитоотделяемыми носителями и придают биокаталитической системе уникальные свойства за счет большой поверхности МНЧ. Такие биокаталитические системы позволяют варьировать каталитические свойства этих систем, используя различные носители и модификаторы.

Проведено сравнение свойств глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганических носителях различной природы и выявлена корреляция структуры синтезированных биокатализаторов и их эффективности в реакции окисления Д-глюкозы.

Процесс окисления Д-глюкозы до Д-глюконовой кислоты имеет большое промышленное значение. Разработанные автором неорганические носители для иммобилизации глюкозооксидазы показали высокую активность и стабильность и могут быть использованы при создании промышленных биокатализаторов. Предложенные автором магнитоотделяемые биокатализаторы позволяют осуществить его магнитное осаждение из реакционного раствора без применения сложной системы фильтров и, таким образом, исключить из процесса стадию очистки продукта от катализатора, что, безусловно, очень важно при промышленной реализации ферментативного окисления Д-глюкозы до Д-глюконовой кислоты, поскольку повышает технологический уровень и экологичность процесса.

Таким образом, полученные в ходе диссертационного исследования данные имеют высокую **теоретическую и практическую значимость**, поскольку дают направление для создания новых типов магнитоотделяемых биокатализаторов глюкозооксидазы, позволяют оптимизировать подбор неорганических носителей, повышая технологический уровень ферментативного окисления Д-глюкозы до Д-глюконовой кислоты, снижая экономические и экологические потери.

слоистая кремниевая оболочка сначала $\text{Si}(\text{OH})_4$, затем поверхность модифицируется NH_2 -группами под воздействием 3-аминопропилтриэтоксисилана. Затем, после осушки образца присоединяется глутаровый альдегид и, наконец, далее буферный раствор глюкозооксидазы. Получается четырехслойная «шуба», снаружи которой находится фермент. Всего было синтезировано 8 образцов таких магнитоотделяемых катализаторов. Биокатализаторы на традиционных носителях Al_2O_3 и SiO_2 модифицировались аминопроизводным силаном и глутаровым альдегидом.

Методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) исследованы структуры, морфология и размеры МНЧ.

Исследование магнитных свойств исходных носителей и полученных образцов биокатализаторов на их основе показало, что независимо от способа получения наночастицы Fe_3O_4 обладают суперпарамагнитными свойствами. Модификация носителя и пришивка глюкозооксидазы не оказывает влияния на магнитные свойства материала. Таким образом, в работе предложен синтез магнитоотделяемых катализаторов, которые можно отделять из реакционной среды в магнитном поле. Это очень важное с химической точки зрения достижение в работе, которое расширяет каталитические возможности полученных биокатализаторов, облегчает технологический процесс катализа и перспективно в плане расширения этих синтезов для других катализаторов.

Далее исследовались иммобилизованные биокатализаторы глюкозооксидазы в реакциях окисления глюкозы до глюконовой кислоты. Определены оптимальные условия процессов. Процесс протекает в две стадии. На первой стадии глюкозооксидаза, являясь аэробной дегидрогеназой, катализирует дегидрирование субстрата и образует глюколактон и перекись водорода. На второй стадии глюколактон гидролизует с образованием глюконовой кислоты. Вторая стадия может происходить химическим гидролизом или с участием фермента глюконолактоназы.

Сравнение результатов окисления глюкозы для нативного и полученных иммобилизованных биокатализаторов показывает, что последние обладают более высокой термической стабильностью, что позволяет сохранять первоначальную активность биокатализатора в течение нескольких циклов синтеза. Эффективность биокатализаторов, полученных на основе МНЧ полиольным способом, по выходу глюконовой кислоты близка к нативному ферменту. Эффективность биокатализаторов на носителях Al_2O_3 и SiO_2 несколько ниже. Автор объясняет этот факт присутствием в МНЧ иона-окислителя $[Fe]^{3+}$, что может ускорять протекание стадии гидролиза глюколактона. Выяснено, что в зависимости от природы, структуры, размера частиц, их поверхности и способа модификации синтезированные биокатализаторы проявляют различную каталитическую эффективность в реакции окисления глюкозы до глюконовой кислоты.

Замечания по диссертации

1. В работе отсутствует четкая характеристика конкретного исходного нативного фермента. Известно, что в промышленных глюкозооксидазах обычно присутствуют другие ферменты – глюконолактоназа, которая катализирует стадию гидролиза глюколактона, и каталаза, которая разлагает перекись водорода. Стандартная реакция, катализируемая тремя ферментами, приводит к образованию из глюкозы глюконовой кислоты. Автор почему-то не рассматривает эту возможность.

2. Повышение эффективности биокатализаторов на МНЧ автор объясняет присутствием в них иона $[Fe]^{3+}$, что облегчает протекание стадии 2 (схема стр 141). Это объяснение уязвимо, так как известно, что лимитирующей является концентрация кислорода в газовой фазе (стадия 3 этой схемы)

Автор показал, что связывание фермента происходит как на поверхности, так и в порах носителей, имеющих различные размеры и распределение, то есть это сложная, многофакторная зависимость и, в настоящее время не представляется возможным дать четкое объяснение этому факту.

3. Использование при хроматографировании в качестве элюэнта раствора серной кислоты исключает возможность обнаружения промежуточных продуктов синтеза и это не доказывает высокую субстратную специфичность глюкозооксидазы.

Заключение по диссертации

Диссертационная работа Голиковой Екатерины Павловны содержит теоретически и практически значимые результаты по синтезу новых типов гетерогенных каталитических систем на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганических носителях, в том числе, наночастицах магнетита, создавая тем самым магнитоотделяемые катализаторы.

Полученные теоретические и экспериментальные данные имеют научную новизну и практическую значимость, что подтверждается большим числом публикаций, включенные в международные базы данных Scopus и Web of Science (5 статей) и рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ.

Основные результаты работы представлены в 8 статьях и международных практических конференциях.

Автореферат отражает основное содержание диссертации.

По актуальности, научной новизне и практической значимости работа соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения научных степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации 24 сентября 2013 года №842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация отвечает паспорту специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) по п.7 «Разработка новых технологических процессов на основе микробиологического синтеза, биотрансформации, биокатализа, иммуносорбции, биодеструкции, биоокисления и создание систем биокомпостирования различных отходов (сточных вод, газовых выбросов и др.), создание замкнутых технологических схем микробиологического производства, последние с учетом вопросов по охране окружающей среды».

На основании изложенного считаю, что диссертационная работа Голиковой Екатерины Павловны полностью отвечает требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Советник при ректорате Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», доктор химических наук, профессор кафедры пищевой биотехнологии

Гамаюрова Валентина Семеновна

Подпись заверяю:

ученый секретарь ученого совета ФГБОУ ВО «КНИТУ»

З. В. Коновалова



« 14 » 2019 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

420015 г. Казань, ул. К. Маркса, д. 68

тел. +79178949755, e-mail: gamaur@kstu.ru