

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию
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 темы. Диссертационное исследование Голиковой Е.П. посвящено разработке стабильных биокаталитических систем на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганических носителях, в том числе, обладающих магнитными свойствами. В задачи исследования входило не только провести синтез магнитоотделяемых биокатализаторов, исследовать их структуру, каталитические свойства, но и охарактеризовать процессы окисления глюкозы до глюконовой кислоты с использованием разработанных биокатализаторов, на основании полученных данных, провести сравнительный анализ эффективности гетерогенных биокатализаторов в зависимости от их структурных особенностей.

Как известно, биотехнология – наука XXI века. Это связано не только с прорывными методами молекулярной биотехнологии, но и с попытками человечества перейти на ресурсосберегающие и чистые технологии, в том числе в области химического синтеза. В настоящее время разработка новых эффективных и экологически безопасных промышленных технологий проходит в рамках научного направления, известного как «зелёная» химия. Катализ является одним из ключевых направлений зеленой химии, поскольку непосредственно связан с некоторыми другими ее принципами. Катализ развивается бурными темпами по таким направлениям как: катализ наночастицами; цеолиты и мезопористые катализаторы; закрепление гомогенных катализаторов на носителе; предотвращение потерь катализатора; катализ ферментами, в том числе закрепленными (гетерогенизированными). Следует отметить, что в диссертационной работе Голиковой Е.П. все эти подходы при разработке эффективного катализатора рассматриваются в комплексе, а создание высокоспецифичного катализатора окисления глюкозы до глюконовой кислоты на основе фермента глюкозооксидазы, безусловно, является предметом биотехнологии. Как совершенно справедливо отмечает автор диссертации, использование ферментов сопряжено с "традиционными" затруднениями, связанными с их инактивацией и относительно высокой стоимостью. Иммобилизация ферментов в матрице носителей позволяет получать стабильные

биокатализаторы с возможностью их неоднократного применения. Однако при этом создаются диффузионные ограничения для субстратов и продуктов реакции. Еще одним подходом для получения гетерогенных биокатализаторов является закрепление молекул ферментов на поверхности носителей. Для повышения каталитической активности этих систем используют наноразмерные материалы, которые характеризуются высокой удельной поверхностью, что позволяет иммобилизовать на носителе большее количество белковых молекул. Среди таких материалов магнитные наночастицы приобретают все больший интерес в качестве матрицы для иммобилизации биомолекул, поскольку они облегчают отделение функциональных материалов за счет своих магнитных свойств. Для коллоидной стабилизации магнитных наночастиц проводят модификацию их поверхности, в том числе неорганическими материалами, такими как диоксид кремния, с образованием частиц типа "ядро-оболочка» (core-shell), поверхность которых легко функционализировать аminosиланами для ковалентного присоединения биомолекул. Несмотря на то, что пути синтеза таких гибридных материалов хорошо известны, еще недостаточно фактического материала в исследованиях по разработке такого типа биокатализаторов, поэтому любые шаги, сделанные в этом направлении, позволяют выявить критические факторы формирования определенных структур гибридных материалов и влияния их структурных особенностей на функционирование иммобилизованных ферментов.

Таким образом, исходя из вышесказанного, можно утверждать, что тема диссертационной работы Голиковой Е.П., безусловно, актуальна. Цель и задачи, сформулированные автором, находятся в русле современного направления развития биотехнологии.

Научная новизна и практическая значимость исследований. В диссертационной работе Голиковой Е.П. представлены результаты, обладающие научной новизной и практической значимостью. В частности, различными путями синтезированы гетерогенные биокатализаторы на основе неорганических пористых носителей, включая магнитные носители со структурой «ядро-оболочка» и ковалентно иммобилизованной глюкозооксидазы, которые всесторонне охарактеризованы современными методами исследований наноматериалов. Полученные результаты вносят существенный вклад в развитие методологии получения и изучения таких гибридных материалов. На основе сравнительного анализа эффективности синтезированных разными методами и/или в разных условиях гетерогенных биокатализаторов удалось выявить участие оксида железа и реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты под действием глюкозооксидазы, что приводит к увеличению эффективности процесса.

Результаты, полученные автором работы, могут быть использованы для совершенствования технологии синтеза многих продуктов и полупродуктов в производстве фармацевтических препаратов, продуктов питания и др.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Обоснованность и достоверность полученных автором результатов обусловлена использованием целого комплекса физико-химических методов исследования, корректной и правильной интерпретацией полученных данных. Все методики, представленные в экспериментальной части, являются отточенными, а используемые методы позволяют решить поставленные задачи.

Результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на профильных конференциях, в том числе, международных.

Рекомендации по использованию результатов диссертации.

Результаты диссертационного исследования Голиковой Е.П. могут быть использованы в качестве теоретической основы для создания широкого спектра высокоэффективных биокаталитических систем, в том числе, магнитноотделяемых, используемых в фармацевтической, пищевой и др. отраслях промышленности.

Краткая характеристика основного содержания диссертации.

Диссертационная работа Голиковой Е.П. построена по классической схеме и состоит из обзора литературных данных; описания материалов и методов исследования; изложения полученных результатов; выводов; списка цитируемой литературы.

Во введении автором обосновывается актуальность диссертационного исследования, формулируется цель работы и решаемые задачи, выделяет научную новизну и практическую значимость работы. Диссертант убедительно доказывает необходимость разработки стабильных гетерогенных биокатализаторов (в том числе магнитноотделяемых) на основе глюкозооксидазы для получения D-глюконовой кислоты, что обуславливает инновационный подход развития биотехнологии в нашей стране. Следует отметить, что при выборе глюкозооксидазы в качестве объекта исследования, автор, вероятно, исходил также и из теоретической значимости этого фермента как «идеальной модели» для лучшей интерпретации полученных результатов.

Литературный обзор по теме диссертации Голикова Е.П. начинается с рассмотрения способов окисления D-глюкозы с использованием химических реagensов, электрохимическим путем, в присутствии химических катализаторов и ферментов или ферментных препаратов, таким образом, доказывая превосходство ферментативных методов получения D-глюконовой кислоты с использованием глюкозооксидазной реакции. С моей точки зрения, диссертанту следовало бы подробнее остановиться на анализе биотехнологий получения этого вещества, поскольку современное производство глюконовой кислоты является биотехнологическим производством. Далее приводится характеристика фермента глюкозооксидазы – основного объекта исследования, методов иммобилизации фермента и суммирована информация о применении

гетерогенных биокатализаторов на основе глюкозооксидазы, в том числе на основе магнитных материалов, в основном, в биосенсорных устройствах. В следующем разделе литературного обзора диссертант анализирует пути синтеза магнитных наночастиц, как теоретической основы для выбора условий синтеза магнитоотделяемых носителей и модифицирующих агентов для ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы. В последнем разделе литературного обзора кратко суммирована информация о применении D-глюконовой кислоты в пищевой промышленности, медицине, косметологии, как обоснование важности получения этого вещества в промышленности, хотя диссертанту следовало бы сделать акцент на предыдущем разделе, дополнив его информацией об особенностях строения и функционирования подобных биокатализаторов не только на основе глюкозооксидазы. Это, возможно, позволило бы выявить некоторые общие аспекты или, наоборот, особенности таких биокаталитических систем. С другой стороны, автор анализирует, какого рода носители привлекают всё большее внимание со стороны исследовательских и промышленных групп, и отмечает такие положительные качества, как невысокая цена, механическая прочность и лёгкость отделения, что доказывает практическую значимость исследования. Следует отметить, что в списке литературных источников значительная часть ссылок на научные статьи, опубликованные в течение последних пяти лет, что еще раз характеризует актуальность исследования и свидетельствует о научной квалификации автора.

Во второй главе автором приведены разработанные методики синтеза биокаталитических систем на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на мезопористые оксиды (Al_2O_3 , SiO_2) и на магнитные наночастицы (МНЧ) оксида железа. Приводится описание и характеристики лабораторного оборудования и установок, использованных в работе; приведено методическое обоснование расчёта кинетических параметров процесса окисления глюкозы; даётся описание физико-химических методов исследования, которые были использованы автором для характеристики синтезированных им биокатализаторов (ИК-Фурье спектроскопия, ПЭМ, низкотемпературная адсорбция азота и др.). Эту главу автор дополняет обоснованием выбора методов с описанием логики исследования на основе анализа цитируемых в этой главе исследований других авторов, что необычно для экспериментальной части диссертации. Важно отметить, что исследование выполнено с использованием целого ряда современных методов исследований наноматериалов (спектроскопия с использованием ИК-Фурье нового поколения, снабженного приставкой диффузного отражения и позволяющего анализировать неоднородные образцы с высокой точностью; метод низкотемпературной адсорбции с последующей

обработкой экспериментальных данных в рамках БЭТ-анализа; рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия; трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия) и на высоком научно-методическом уровне. Таким образом, использованные в работе методы позволяют решать поставленные в работе задачи.

Для получения результатов мирового уровня были выполнены совместные экспериментальные исследования на уникальном оборудовании химического факультета университета Индианы. Это, безусловно, огромный плюс данной диссертационной работы! Представление и обсуждение полученных различными методами результатов свидетельствует о высоком научно-методическом уровне молодого ученого.

В третьей главе изложены результаты диссертационного исследования и их обсуждение.

Автором приводятся результаты, полученные в ходе оптимизации методов синтеза биокатализаторов, в том числе, магнитноотделяемых. Показана разница между магнитными наночастицами, получаемыми методом соосаждения и полиольным методом, установленная посредством определения структуры и морфологии образцов. Приводятся данные, полученные в ходе исследования магнитных свойств исходных носителей и биокатализаторов на их основе. Показано, что образцы исходных носителей являются магнитомягкими ферромагнетиками, а модификация носителя и иммобилизация фермента не оказывает влияния на магнитные свойства материала.

Методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией установлена структура исходных и модифицированных частиц магнетита, получаемого разными свойствами; определён размер магнитных наночастиц. Показано, что строение модифицированных МНЧ соответствует структуре «ядро-оболочка», т.е. частицы содержат ядро «Fe» и оболочку «Si». Исследования магнитных свойств носителей и биокатализаторов позволило заключить, что иммобилизация фермента и увеличение температуры реакционной среды до рабочей температуры 40⁰C практически не изменяет магнитные свойства материала, что важно для практической разработки биокатализаторов.

Важным аспектом работы является доказательство ковалентного характера связи фермента с поверхностью носителей, модифицированных TEOS, APTES и глутаровым альдегидом, с использованием двух независимых методов – ИК-спектроскопии и рентгенофотоэлектронной спектроскопии.

Изучение пористости и удельной поверхности образцов проводили методом низкотемпературной адсорбции азота. Полученные результаты очень подробно описаны для каждого образца в отдельности. Все материалы охарактеризованы как мезопористые с приблизительно одинаковой удельной

поверхностью, что важно для выяснения критических параметров, влияющих на свойства биокатализатора.

После характеристики структуры и физико-химических свойств полученных материалов автор приводит результаты исследования каталитических свойств синтезированных биокатализаторов. Основываясь на критерии «наибольший выход продукта – глюконовой кислоты», определены оптимальные условия окисления D-глюкозы в присутствии нативного фермента и биокатализаторов на основе иммобилизованной глюкозооксидазы. В ходе изучения процесса окисления в зависимости от исходной массы субстрата в реакторе показано, что избыток глюкозы ингибирует активность как нативного, так и иммобилизованного фермента, что характерно для некоторых ферментов. В тоже время ингибирование иммобилизованной глюкозооксидазы происходит в значительно меньшей степени. Данные о влиянии температуры и pH на активность нативной и иммобилизованной глюкозооксидазы закономерны и свидетельствуют о стабилизации фермента на носителях. Автором проведена оценка стабильности биокатализаторов; определены образцы, сохраняющие активность после 10 последовательных циклов использования.

Для сравнительного анализа эффективности биокатализаторов диссертант использует стандартные параметры уравнения ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен, поскольку зависимость скорости биохимической реакции от концентрации глюкозы имеет гиперболический вид.

В заключительном разделе этой главы диссертант проводит сравнительный анализ результатов исследования гетерогенных катализаторов методами низкотемпературной адсорбции азота, ИК-спектроскопии, рентгенофотозлектронной спектроскопии и их биокаталитической активности. Показано, что все магнитные носители гетерогенных катализаторов имеют близкую удельную поверхность (порядка 50 м²/г), но биокатализаторы на основе МНЧ имеют разную активность в зависимости от способа получения. Эти результаты являются отправной точкой для дальнейших исследований по выявлению зависимости состава и структуры магнитных носителей на свойства иммобилизованных ферментов. Безусловно, получены интересные результаты, которые автор, к сожалению, детально не обсуждает в свете сравнения с результатами других исследований, что, вероятно, позволило бы получить новые знания в этой области.

Таким образом, диссертантом получен очень большой массив экспериментальных результатов, которые еще можно анализировать, в частности, при сравнении с результатами изучения подобных каталитических систем, но на основе других ферментов. В заключении автором приведены обоснованные выводы по результатам исследовательской работы.

Вопросы и замечания по работе. В ходе анализа диссертационной работы Голиковой Е.П. возникли некоторые вопросы и могут быть сделаны замечания:

1. При изучении поверхности биокатализаторов методом низкотемпературной адсорбции азота используются жесткие для белков условия подготовки образца, а именно промывка этиловым спиртом и высушивание при температуре + 200 С, а затем и + 400 С. В этих условиях происходит отжиг фермента с поверхности носителя, которая сформировалась до его присоединения, а значит не должна сильно измениться после отжига. Как это повлияет на получение результатов и их интерпретацию? Кроме того, при обсуждении полученных этим методом результатов диссертант не всегда использует одинаковые термины при описании величины пор. Так, на стр. 107 на основании размеров пор в образце меньше 6 нм автор делает вывод о наличии микропор в образце (микропоры – меньше 2 нм), в то время как на странице 108 делает заключение о мезопористой структуре материала со средним размером пор 3-5 нм.

2. Результаты по определению выхода продукта – глюконовой кислоты представлены диссертантом с точностью до сотых процента. Сомнительно, что в биотехнологическом эксперименте можно получить результаты с такой точностью.

3. При определении оптимального времени окисления глюкозы в присутствии нативной глюкозооксидазы диссертант приводит данные о снижении выхода D-глюконовой кислоты при длительном времени эксперимента. Однако из представленных в диссертации данных не ясно, как проводили эксперимент. Если отбирали пробы из одного реактора через определенные промежутки времени, то не понятно, куда пропала уже образовавшаяся D-глюконовая кислота?

4. При определении (расчете) параметров уравнения Михаэлиса-Ментен диссертант использует традиционный подход, заключающийся в линеаризации гиперболической зависимости. В настоящее время с развитием методов компьютерной обработки зависимостей в этом нет никакой необходимости, а вот представлять данные следует с учетом статистической обработки. Округлять численные значения параметров уравнения следует до значащей цифры, которую можно определить по стандартному отклонению, представленному программой обработки данных.

5. Для стабилизации МНЧ магнетита и предотвращения их агрегации в полиольном методе синтеза автором используется этиленгликоль. Далее, при обсуждении результатов, констатируется, что при уменьшении количества этиленгликоля размер частиц уменьшается, т.е. большее содержание этиленгликоля способствует агрегации частиц Fe_3O_4 . Данный факт достаточно интересен и требует большего обсуждения. Во-первых, чем может быть обусловлено, по мнению автора, данное обстоятельство? Этиленгликоль в обоих случаях берётся в огромном избытке (0,36 и 0,54

моль этиленгликоля против 0,003 моль FeCl_3), так что влияние концентрации полиола с высокой степенью вероятности можно исключить. Кроме того, более логичным выглядело бы уменьшение частиц при увеличении объёма этиленгликоля (т.е. объёма реакционной смеси). Во-вторых, возможно ли получение частиц ещё меньших размеров при объёмах этиленгликоля менее 20 мл?

6. Автором работы указывается, что «При большем размере МНЧ (430 ± 60 нм для $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$) и при меньшем их размере (111 ± 5 нм для $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$), биокатализаторы обладают чуть меньшей активностью, что возможно связано с «неполным» распределением (конформационным расположением) молекулы GOx на их поверхности». Насколько корректным представляется данное предположение, если учитывать, что размер молекулы глюкозооксидазы составляет 6,0 нм x 5,2 нм x 7,7 нм, и он значительно меньше размеров МНЧ? Что конкретно автор подразумевает под «неполным» распределением молекулы фермента на поверхности?

7. В тексте диссертации и автореферата встречаются опечатки и неточности. Так, в списке литературы в диссертации некоторые ссылки (76-78) представлены без названия статей; в качестве сокращения для соединения «3-аминопропилтриэтоксисилан» в тексте используется сокращение APTEs, а на рисунках APTS. В автореферате на рис. 3(а,в) отсутствует бар-метка.

Указанные недостатки не влияют на высокую оценку работы в целом. Цель проводимых автором исследований, теоретические и экспериментальные методы решения поставленных задач, а также заключительные выводы логически связаны и оптимальны. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Публикация основных результатов диссертации и соответствие автореферата положениям диссертации

Основные результаты изложены в 17 публикациях, в том числе 5 в изданиях, включенных в международные реферативные базы данных Scopus и Web of Science, причем 3 статьи опубликованы в высокорейтинговых международных журналах (суммарный импакт-фактор 13,4). Безусловно, это свидетельствует о признании мировой научной общественностью полученных диссертантом результатов. Таким образом, в ходе диссертационной работы получены результаты мирового уровня.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают результаты диссертации.

Общее заключение.

Диссертационная работа Голиковой Е.П. является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных диссертантом комплексных исследований в области химии и биотехнологии содержится решение научной задачи по разработке магнитоотделяемых биокатализаторов (важное преимущество которых – магнитное осаждение из реакционного раствора, что позволяет исключить стадии очистки продукта от катализатора в производственных процессах), имеющей значение для

развития современных технологий синтеза многих продуктов и полупродуктов в производстве фармацевтических препаратов, продуктов питания и др. на основе принципов зеленой химии и с использованием методов биотехнологии.

Диссертационная работа, представленная к защите Голиковой Екатерины Павловны, удовлетворяет всем критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, и пункта 7 паспорта специальности 03.06.01 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент
доктор химических наук
по специальности 03.06.01 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии),
доцент, заведующая кафедрой биотехнологии
ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»
300012 г.Тула, пр.Ленина, 92.
тел. (раб) +7(4872) 25 79 29
тел. (моб) +7(915) 783 80 13
E-mail: olgaponamoreva@mail.ru

27.05.2019 г

Понаморева Ольга Николаевна

*Подпись Понаморевой О.Н. заверено
Честной электронной печатью (И.И. Кошар)*

