

ОТЗЫВ

**официального оппонента Шнайдер Ксении Леонидовны
на диссертационную работу Сульман Александрины Михайловны на
тему: «Гетерогенные биокатализаторы на основе глюкозооксидазы,
иммобилизованной на магнитоотделяемые мезопористые оксиды»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических
наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)**

Актуальность проблемы

На сегодняшний день ферменты являются неотъемлемой частью биотехнологической промышленности и активно применяются в разнообразных технологических процессах. Развитие биотехнологии и генной инженерии способствовало производству эффективных и недорогих ферментов с новыми свойствами, в том числе иммобилизованных, что позволило успешно заменить классические химические каталитические системы в ряде промышленных процессов на энзиматические. Преимущества ферментативного катализа в сравнении с химическим не вызывают сомнений, а запрос на развитие так называемых углеродно-нейтральных технологий дает возможность расширить спектр применения биологических катализаторов.

Объектом исследования в данной работе является фермент глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4; β -D-глюкоза : кислород оксидоредуктаза), который в последние годы находит широкое применение как в свободном, так и в иммобилизованном виде в биотехнологии, в фармацевтической и пищевой отраслях промышленности, в синтезе биологических активных веществ, в клинической и аналитической химии. Автором оппонируемой диссертации решается проблема получения стабильных, не уступающих по своей активности нативному ферменту, легко отделяемых иммобилизованных препаратов глюкозооксидазы, в том числе с использованием магнитных наночастиц (МНЧ).

Хорошо известно, что иммобилизация ферментов позволяет получать технологические биокатализаторы, которые могут быть многократно использованы. Однако их отделение от реакционной смеси требует отдельной стадии процесса и иногда бывает затруднительным. Кроме того такие препараты часто недостаточно стабильны, а их эффективность обычно недостаточна для применения в промышленных масштабах. В связи с этим поиск путей повышения стабильности и активности иммобилизованных ферментных препара-

тов, в том числе магнитоотделяемых, является **актуальной** проблемой биотехнологии.

Научная новизна и практическая значимость работы

Автором оппонируемой диссертации созданы гетерогенные биокатализаторы глюкозооксидазы путем ковалентного связывания фермента с модифицированными магнитоотделяемыми мезопористыми оксидами циркония, полученными методом реплики. Синтезированные магнитоотделяемые биокатализаторы сохраняют операционную стабильность с незначительной потерей исходной активности фермента, что дает возможность их многократного использования.

Разработанные автором гетерогенные биокатализаторы на основе глюкозооксидазы показали высокую активность и стабильность в широком диапазоне температуры и pH, что делает исследуемые носители перспективными для создания других промышленных биокатализаторов на их основе. Детально изучена структура магнитоотделяемых оксидов. Полученные автором магнитоотделяемые биокатализаторы могут быть легко отделены от реакционной системы с использованием внешнего магнитного поля, что позволяет упростить стадию очистки целевого продукта от катализатора или полностью ее исключить, что весьма эффективно с экономической и экологической точки зрения.

Изучено влияние кислотных центров Льюиса и Бренстеда носителей на ферментативную активность иммобилизованной глюкозооксидазы и выявлена корреляция структуры синтезированных биокатализаторов и их активности в реакциях окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

Получение D-глюконовой кислоты, образующейся при гидролизе δ -глюконо-1,5-лактона, конечного продукта окисления D-глюкозы глюкозооксидазой, имеет большое практическое применение.

Таким образом, полученные в ходе исследования данные имеют высокую **теоретическую и практическую значимость**, поскольку дают направление для создания новых типов магнитоотделяемых биокатализаторов глюкозооксидазы и других промышленно значимых ферментов, активных и стабильных в широком диапазоне температуры и pH, позволяют повысить технологический уровень, экономическую и экологическую эффективность процесса получения D-глюконовой кислоты.

Диссертация построена по классической схеме, содержит введение, три главы, заключение и список литературы. Текст работы изложен на 144 стра-

ницах, включает 60 рисунков и 15 таблиц. Список литературы содержит 234 наименования.

Первая глава диссертации посвящена анализу литературных данных о ферментах – высокоэффективных биологических катализаторах. Рассмотрены физико-химические методы иммобилизации ферментов, классические и новые носители для иммобилизации, в том числе мезопористые. Рассмотрено использование магнитных наночастиц для ковалентного связывания ферментов и создание на их основе магнитоотделяемых биокатализаторов. Описано строение фермента глюкозооксидазы, его применение и механизм окисления D-глюкозы.

На основании литературных данных сделан вывод о том, что мезопористые материалы, поры которых содержат наночастицы магнетита перспективны в качестве носителей для иммобилизации глюкозооксидазы.

Во второй главе диссертации приведены характеристики используемых реактивов и методики проведения экспериментов, включая методики синтеза магнитоотделяемых оксидов и их функционализации. Представлены методики иммобилизации глюкозооксидазы на магнитоотделяемые носители и окисления полученными биокатализаторами D-глюкозы. Автор использует ряд инструментальных методов исследования. Приведены характеристики приборов, используемых в диссертационной работе – высокоэффективная жидкостная хроматография, низкотемпературная адсорбция азота, рентгеновская фотоэлектронная, инфракрасная, просвечивающая и сканирующая энергодисперсионная спектроскопии, рентгеновская дифракция. Для измерения магнитных характеристик намагниченности образцов исследования был применен метод вибрационного магнитометра. Кинетические расчеты проведены классическими методами с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен и графическим методом Лайнуивера-Берка.

В третьей главе диссертации приводятся результаты экспериментов и их обсуждение. В первую очередь были синтезированы магнитоотделяемые носители на основе диоксида кремния и оксида алюминия методом кристаллизации наночастиц магнетита в мезопорах оксидов и подобраны оптимальные условия процесса. Полученные образцы подвергались функционализации 3-аминопропилтриоксисиланом (APTES). Методом низкотемпературной адсорбции азота оценивалась пористость полученных носителей. Установлено, что после образования в порах оксида железа и диоксида кремния МНЧ размеры пор уменьшаются.

Для создания биокатализатора имеющего лучшие механические характеристики, соответственно более устойчивого к истиранию были синтезированы магнитоотделяемые носители на основе оксида циркония ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-300}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-400}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600}$). Для этого использовался подход на основе темплатов. Методом низкотемпературной адсорбции азота установлено, что пористость и диаметр пор полученных носителей уменьшаются с ростом температуры прокаливания и после включения МНЧ.

Показано, что оксиды кремния, алюминия и циркония относятся к мезопористым материалам.

Методами просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской дифракции исследованы размеры, морфология и структура МНЧ. Состав поверхности магнитоотделяемых оксидов, а также степень окисления железа в МНЧ определялись методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии.

Исследованы магнитные свойства полученных образцов мезопористых носителей на основе оксида циркония. Показано, что независимо от способа получения наночастицы Fe_3O_4 обладают суперпарамагнитными свойствами. Наибольшей намагниченностью характеризуется образец $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-400}$. Пришивка глюкозооксидазы к носителю не оказывает влияния на магнитные свойства материала и каталитическую активность фермента. Это расширяет возможности получения иммобилизованных биокатализаторов и их применения, а также облегчает процесс катализа с технологической точки зрения.

В дальнейшем магнитоотделяемые мезопористые оксиды кремния, алюминия и циркония использовались в качестве носителей для иммобилизации. После функционализации их поверхностей АРТЕS и реакции со сшивающим агентом (глутаровый альдегид) проводилось ковалентное присоединение глюкозооксидазы. Установлено, что, несмотря на уменьшение площади поверхности носителей на основе оксидов кремния и алюминия после иммобилизации и смещение распределения пор к меньшим значениям каталитическая активность фермента увеличивается. Автор связывает этот факт с тем, что МНЧ оксида железа являются сокатализатором фермента и обладают ферментоподобной активностью.

Иммобилизация глюкозооксидазы на магнитоотделяемые мезопористые оксиды кремния и алюминия позволяет повысить коэффициент иммобилизации в сравнении с исходными оксидами. Аналогичное увеличение наблюдается в случае оксидов циркония. При этом коэффициент иммобилизации в основном зависит от температуры кальцинирования диоксида цирко-

ния. Увеличение эффективности иммобилизации автор связывает с присутствием Fe_3O_4 .

Далее исследовались каталитические свойства иммобилизованных препаратов глюкозооксидазы на магнитоотделяемых мезопористых оксидах в реакциях окисления D-глюкозы. Получено четыре образца биокатализаторов на основе оксидов алюминия и кремния, среди которых $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-GOx}$ обладает достаточно высокой ферментативной активностью в широком диапазоне pH и температуры, что отличает данный биокатализатор от нативного фермента, имеющего ярко выраженный температурный оптимум и оптимум pH. Из шести образцов на основе оксида циркония наибольшая активность наблюдалась для $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$. Полученные биокатализаторы ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-GOx}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$) имеют самое высокое сродство к субстрату и самую высокую скорость реакции, что, несомненно, является важным достижением и раскрывает перспективы их применения в клинической диагностике, медицине и химической промышленности.

Методом ИК-Фурье спектроскопии установлена корреляция сил Бренстедовских кислотных центров поверхности подложки с активностью каталитического подцентра активного центра фермента, иммобилизованного на оксидах кремния и алюминия, в том числе магнитоотделяемых. В то же время основность не коррелирует с каталитической активностью.

Получены магнитоотделяемые биокатализаторы обладающие более высокой стабильностью в сравнении с биокатализаторами на основе оксидов кремния, алюминия и циркония. Наилучшую операционную стабильность проявляет $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$, что связано с высокой устойчивостью к истиранию ZrO_2 . Это позволяет рекомендовать магнитоотделяемый биокатализатор $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$ для многократного применения.

Замечания по диссертации

1. В работе не приводится информация о статистической обработке и, соответственно, статистической достоверности полученных результатов.

2. Автор связывает более высокую относительную ферментативную активность полученных магнитоотделяемых биокатализаторов с ферментоподобной активностью Fe_3O_4 . Однако в диссертации не уточняется принцип такого влияния. Возможно, автор имеет в виду, что Fe_3O_4 обладает собственной каталитической активностью либо является активатором глюкозооксидазы.

3. Гетерогенные биокатализаторы на основе глюкозооксидазы использованы в работе сразу после их получения. В диссертации не приводится информация о том можно ли хранить иммобилизованные препараты долго-срочно, в какой форме и в каких условиях, а также, не теряют ли полученные биокатализаторы ферментативную активность в процессе хранения.

4. В работе была рассчитана кинетика ферментативного процесса, но не указано учитывались ли автором при расчете диффузионные ограничения, часто возникающие в гетерогенных системах.

5. В тексте диссертации встречаются стилистические неточности, ошибки и опечатки.

6. Имеются замечания к оформлению диссертации (например, стр. 82-84). Следует соблюдать правила технического редактирования. Погрешности в оформлении затрудняют чтение и понимание работы.

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования А.М. Сульман.

Заключение по диссертации

Диссертационная работа Сульман Александрины Михайловны содержит теоретически и практически значимые результаты по синтезу новых типов гетерогенных биокатализаторов на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на мезопористых оксидах путем ковалентного связывания, в том числе, с наночастицами магнетита в мезопорах, создавая тем самым магнито-отделемые катализаторы.

Полученные теоретические и экспериментальные данные имеют научную новизну и практическую значимость, что подтверждается большим числом публикаций, включенных в международные базы данных Scopus и Web of Science и рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ (11 публикаций).

Основные результаты работы представлены в 9 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 от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация отвечает паспорту специально-

сти 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 работы Сульман Александрины Михайловны 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:

Доцент кафедры «Пищевая биотехнология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», кандидат химических наук



Шнайдер Ксения Леонидовна

Подпись заверяю:

Ученый секретарь ученого совета ФГБОУ ВО «КНИТУ»

З.В. Коновалова



« 07 / 07 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»)
420015, г. Казань, ул. Толстого 8/31, корп. «К»
тел.: +7 (843) 231-89-12, e-mail: 0202-84@mail.ru