

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию
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 темы. Диссертационная работа Сульман А.М. представляет собой всестороннее исследование по разработке магнитоотделяемых гетерогенных биокатализаторов на основе глюкозооксидазы и мезопористых оксидов кремния, алюминия и циркония, модифицированных ферромагнитными наночастицами, для усовершенствования технологии получения D-глюконовой кислоты с использованием принципов «зеленой» химии. Исследования по теме диссертации носят междисциплинарный характер, поэтому для достижения поставленной цели диссертантом решался комплекс задач, включая: - синтез мезопористых неорганических носителей (в частности, оксида циркония); - модификацию их магнитными наночастицами оксида железа (II, III) *in-situ* и функционализацию поверхности; - ковалентную иммобилизацию глюкозооксидазы на носителях с использованием бифункционального сшивающего агента; - характеристику структурных, поверхностных, магнитных и ряда других физико-химических свойств синтезированных носителей и биокатализаторов; - полное описание свойств полученных гетерогенных биокатализаторов в реакции окисления глюкозы до глюконовой кислоты для дальнейшей разработки биотехнологического процесса.

Биокатализаторы на основе иммобилизованных ферментов (гетерогенные биокатализаторы) привлекают большое внимание при разработке тонких технологий синтеза биологически активных соединений, так как обладают высокой каталитической эффективностью, специфичностью, обеспечивают высокие выходы целевого вещества при отсутствии побочных продуктов. Важными преимуществами гетерогенных биокатализаторов являются повышенная стабильность в определенном диапазоне pH и температур, технологичность при отделении от реакционных смесей, стабильность при многократном использовании и др. Все это обусловлено применением специфических носителей для иммобилизации биоматериала. В последние годы все большее внимание привлекают магнитные наночастицы (МНЧ) как универсальные носители биоматериала благодаря их уникальным магнитным свойствам, большой площади поверхности, значительным отношением поверхности к объему, высокой скорости массопереноса и др., что отмечается в нескольких последних обзорах по биологическому применению магнитных наночастиц, в том числе, для иммобилизации ферментов. Анализ достижений в этой области приведен в нескольких последних обзорах (doi:10.1016/bs.mie.2019.11.006; doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.025; doi:10.1016/j.coche.2019.06.005). Для получения универсальных стабильных магнитных носителей используют в сочетании с МНЧ мезопористые неорганические инертные материалы. В отличие от немагнитных носителей, такие магнитные носители можно легко отделить с помощью внешнего магнитного поля. Прочное связывание ферментов с носителями обеспечивается ковалентной сшивкой, что требует наличия функциональных групп на поверхности неорганических носителей и является отдельным аспектом исследований по получению гетерогенных биокатализаторов. Иммобилизация ферментов методами ковалентной сшивки может не только увеличить стабильность биокатализатора, но и привести к потере его активности, поэтому необходимо экспериментально подбирать условия «мягкой»

иммобилизации белков на поверхности носителя. В диссертационной работе Сульман А.М. все эти подходы при разработке эффективного биокатализатора окисления глюкозы до глюконовой кислоты рассматриваются в комплексе на примере фермента глюкозооксидазы, мезопористых неорганических оксидов и МНЧ. Несмотря на то, что основным способом получения глюконовой кислоты в промышленном масштабе остается ферментация глюкозы под действием дрожжей *Aspergillus niger*, не прекращаются исследования по разработке технологий получения этого ценного вещества с помощью индивидуального фермента – глюкозооксидазы. Проблемы и перспективы этой технологии подробно обсуждаются в обзоре 2020 года (doi: 10.1039/d0cy00819b).

Таким образом, исходя из вышесказанного, можно утверждать, что тема диссертационной работы Сульман Александрины Михайловны, безусловно, актуальна и с теоретической, и с практической стороны. Цель и задачи, четко сформулированные автором, находятся в русле современного направления развития биотехнологии и биокатализа, в частности.

Научная новизна и практическая значимость исследований. В диссертационной работе Сульман А.М. представлены результаты, обладающие научной новизной и практической значимостью. Особенно интересны, с позиции научной новизны и практической значимости, как мне кажется, результаты, полученные при разработке и характеристики материалов и биокатализаторов на основе оксида циркония. В частности, методом реплики, впервые с применением жесткого шаблона – мезопористого оксида кремния, синтезирован мезопористый оксид циркония, и выявлены закономерности модификации мезопористых оксидов магнитными наночастицами Fe_3O_4 *in situ*, что открывает новые возможности для направленного синтеза магнитных носителей с заданными параметрами для дальнейшей иммобилизации ферментов. Биокатализаторы на основе оксида циркония обладают более высокой устойчивостью к истиранию, что согласуется со свойствами этого неорганического материала. Впервые представлены результаты и их обоснование по влиянию кислотных центров Льюиса и Бренстеда неорганических носителей на активность фермента (глюкозооксидазы). Предложенные в работе подходы к синтезу магнитоотделяемых мезопористых оксидов и их функционализация могут быть использованы для создания других промышленно значимых биокатализаторов, в том числе, мультиферментных катализаторов для каскадных реакций.

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 Сульман А.М. могут быть использованы в качестве теоретической основы для создания широкого спектра высокоэффективных биокаталитических систем, в том числе, магнитоотделяемых, используемых в фармацевтической, пищевой и др. отраслях промышленности, а также для разработки новых методов лечения злокачественных опухолей.

Краткая характеристика основного содержания диссертации.

Диссертационная работа Сульман А.М. изложена на 144 страницах, включает 60 рисунков и 15 таблиц, список литературы содержит 234 ссылки. Диссертация построена по классической схеме и состоит из обзора литературных данных; описания материалов и методов исследования; изложения полученных результатов; выводов; списка цитируемой

литературы. Однако соискатель назвал Главу 2 - «Методы экспериментов и анализа», а Главу 3 – «Экспериментальная часть». Традиционно используют другие названия для этих глав, и, если название Главы 2 можно допустить в таком варианте, то Главу 3 лучше назвать «Результаты и их обсуждение». Название «Экспериментальная часть» – не совсем верное, так как «Методики эксперимента и анализа» – это тоже экспериментальная часть, а в Главе 3 описаны не только эксперименты, но и их интерпретация, обсуждение с применением теоретических моделей и т.д.

Во введении автор обосновывает актуальность диссертационного исследования, формулирует цель работы и решаемые задачи, выделяет научную новизну и практическую значимость работы. Диссертант убедительно доказывает необходимость разработки стабильных гетерогенных магнитоотделяемых биокатализаторов на основе глюкозооксидазы для получения D-глюконовой кислоты, что обуславливает инновационный подход развития биотехнологии в нашей стране. Следует отметить, что выбор объекта исследования – глюкозооксидаза, не случайный. Кроме важной роли глюкозооксидазы для разработки «зеленой» технологии получения глюконовой кислоты, он имеет большую теоретическую значимость, т.к. часто используется как «идеальная модель» фермента в различных исследованиях.

Литературный обзор по теме диссертации (40 страниц) характеризуется тщательным анализом предшествующих исследований - внушительный список цитируемых источников (около 200 из 232 ссылок в общем списке литературы), причем, более 65% ссылок – это ссылки за 2011-2016 гг., и 40% - за пять последних лет. В диссертации хорошо прописаны причинно-следственные связи, включая литературный обзор. Он охватывает все аспекты исследований по теме диссертации, написан вдумчиво, интересно, иллюстрирован схемами и диаграммами, что позволяет акцентировать внимание читателя на основных моментах и логике проведенного анализа. На основе проведенного анализа в заключение к Главе 1 «Литературный обзор» диссертант обосновывает выбор направления исследований.

Во второй главе (20 страниц) автором приведены методики синтеза биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов кремния, алюминия и циркония, в том числе, методика разработанного синтеза оксида циркония и его модификация наночастицами; методики окисления глюкозы полученными биокатализаторами; методика анализа реакционной смеси методом ВЭЖХ; и описаны методы исследования синтезированных носителей и биокатализаторов (метод вибрационного магнитомера, метод низкотемпературной адсорбции азота, метод рентгенофотоэлектронной спектроскопии, ИК-Фурье-спектроскопии, рентгеновской дифракции, просвечивающей электронной микроскопии, сканирующей энергодисперсной спектроскопии). Представленный спектр используемых методов исследования свидетельствует о высокой экспериментальной и теоретической квалификации соискателя и мировом уровне исследований, использованные в работе методы позволяют решать поставленные в работе задачи.

В третьей главе (60 страниц – половина диссертации без учета списка литературы) представлены результаты физико-химического исследования синтезированных магнитоотделяемых носителей и биокатализаторов на их основе.

С использованием различных вышеуказанных физико-химических автор характеризует синтезированные гетерогенные носители, а именно, мезопористые оксиды циркония, полученные с использованием в качестве жесткого шаблона мезопористого оксида кремния с размером пор 6 нм. Оказалось, что при варьировании температуры прокаливания можно получать разные структуры материалов: аморфную (при 300°C), тетрагональную ($t\text{-ZrO}_2$, при 400°C), моноклинную ($m\text{-ZrO}_2$, 62%) и $t\text{-ZrO}_2$ (38%) при 600°C.

На основе представленных в диссертации результатов можно заключить, что подобраны оптимальные условия *in-situ* кристаллизации наночастиц Fe_3O_4 в мезопорах оксидов кремния, алюминия и циркония и разработана схема получения магнитоотделяемых носителей.

Приводятся результаты по получению новых биокатализаторы путем ковалентного связывания глюкозооксидазы бифункциональным сшивающим агентом (глутаровым альдегидом) с исходными и магнитоотделяемыми мезопористыми оксидами кремния, алюминия и циркония, поверхность которых предварительно функционализировали аминогруппами при помощи 3-аминопропилтретоксисилана.

Представлены результаты по исследованию полученных носителей методом низкотемпературной адсорбции азота, которые указывают на мезопористость материалов (размер пор 4-8 нм). На основании результатов просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской дифракции доказано, что наночастицы магнетита формируются в порах (размер 4-8 нм) и в стыках пор (размер 12-13 нм). Кривые намагничивания подтверждают, что полученные наночастицы Fe_3O_4 , независимо от природы оксида, обладают суперпарамагнитными свойствами.

При изучении структуры биокатализаторов методом ИК-Фурье с диффузным отражением и каталитической активности в реакции окисления глюкозы автор убедительно демонстрирует, что сила Бренстедовских кислотных центров коррелирует с активностью глюкозооксидазы, иммобилизованной на исходных и магнитоотделяемых оксидах кремния и алюминия.

В диссертации приведены результаты, свидетельствующие об увеличении относительной активности (на 7-10%) магнитоотделяемых биокатализаторов по сравнению с иммобилизованной на мезопористых оксидах глюкозооксидазы. Автор объясняет это ферментоподобной активностью Fe_3O_4 . Однако не совсем понятно, что автор имеет в виду.

Приведены результаты по определению активности биокатализаторов в реакциях окисления глюкозы. Магнитоотделяемые биокатализаторы $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-GOx}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-GOx}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$ в процессе окисления D-глюкозы показали соответственно 95%, 93% и 98% активности нативного фермента. Сравнительный анализ кинетических параметров ферментативного процесса позволил определить, что наибольшее сродство к субстрату (глюкозе) наблюдается для биокатализатора $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$.

Результаты по изучению стабильности глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитоотделяемых мезопористых оксидах, показали, что в десяти последовательных циклах лучший магнитоотделяемый биокатализатор $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$ теряет не более 7% своей активности, что объясняется высокой устойчивостью к истиранию ZrO_2 . Высокая ферментативная активность биокатализаторов в широком диапазоне pH и температуры делает их перспективными для практического применения.

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 Сульман А.М. возникли некоторые вопросы и могут быть сделаны замечания (некоторые были отмечены выше, но еще раз представлены здесь):

1. Диссертант назвал Главу 2 - Методы экспериментов и анализа, а Главу 3 – Экспериментальная часть. Традиционно используются другие названия для этих глав. И если название Главы 2 можно допустить в таком варианте, то Главу 3 лучше назвать Результаты и их обсуждение. Экспериментальная часть – не совсем правильно, так как Методики эксперимента и анализа – это тоже экспериментальная часть, в Главе 3 описаны не только эксперименты, но и их интерпретация, обсуждение с применением теоретических моделей и т.д.
2. Рекомендую автору в будущем называть разделы и подразделы в основной части диссертации в соответствии с результатами, а не только по названию метода. Например, вместо «Данные низкотемпературной адсорбции азота» дать название «Оценка пористости образцов методом низкотемпературной адсорбции азота»
3. В тексте встречаются опечатки или неточности. Так, на стр. 35 неправильно дано название метилотрофным дрожжам *Pichia pastoris* (вид назван по-русски), которые использованы для получения рекомбинантного фермента, на странице 34 название фермента липазы написано на английском языке подряд после названия микроорганизма, из которого липаза получена; в ссылках 46 и 53 случайно удалена последняя цифра, обозначающая год. Неполное название пункта 2.2. (отсутствует оксид циркония в названии)
4. Прошу автора прокомментировать смысл фразы на странице 41, которая начинается словами: «Различные штаммы микробов, такие как». Из представленного текста непонятно, о чем идет речь.
5. В материалах Главы 2 схемы реакций лучше приводить в формульном редакторе, а не в виде нечетких рисунков (например, рис. 2.4), а фотографии полученных материалов уместно было бы привести в Главе 3, где представлены результаты исследований.
6. На стр. 75 диссертант объясняет увеличение активности иммобилизованной глюкозооксидазы (GOx) на магнитных частицах по сравнению с исходными частицами влиянием Fe₃O₄ на реакцию GOx с функциональными группами глутарового альдегида. На стр. 100 диссертант отмечает, что «синергия между активностью GOx и присущей ферментоподобной активностью магнитных наночастиц (МНЧ) способствует повышению эффективности биокатализатора. В этом случае МНЧ ведут себя как сокатализатор для фермента». Вывод 6 диссертации посвящен этому результату. Не мог бы автор уточнить, что имеется в виду? Известно, что наночастицы Fe₃O₄ и других соединений железа являются прекрасными катализаторами разложения пероксида водорода. Этот эффект, например, используется при разработке хемодинамической терапии злокачественных опухолей на основе реакции Фентона, где GOx эффективно окисляет глюкозу в раковых клетках, при этом образуется значительное количество пероксида водорода, сверхмалые наночастицы Fe₂O₃ эффективным катализатором Фентона для разложения увеличенного количества H₂O₂ в опухоли с образованием высокотоксичных гидроксильных радикалов. Может быть быстрая утилизация одного из продуктов ферментативного превращения глюкозы приводит к увеличению скорости ее окисления под действием GOx?
7. Для определения кинетических характеристик GOx (K_m, V_{max}) диссертант использовал линеаризованное уравнение Михаэлиса-Ментен, что при современном развитии компьютерных систем обработки данных совершенно необязательно. При этом в диссертации не представлены зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (глюкозы), чтобы наглядно продемонстрировать гиперболический характер этой зависимости, число точек на этих зависимостях и т.д.

Публикация основных результатов диссертации и соответствие автореферата положениям диссертации

Основные результаты изложены в 19 публикациях в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных Scopus и Web of Science и в изданиях из рекомендуемого перечня ВАК Минобрнауки РФ, по результатам диссертации подготовлена заявка на патент. Причем, суммарный импакт-фактор статей 17,944 (2019), и 3 статьи опубликованы в журналах, относящихся к квартилю 1 (Q1). Безусловно, это свидетельствует о признании мировой научной общественностью полученных диссертантом результатов. Таким образом, в ходе диссертационной работы получены результаты мирового уровня.

Общее впечатление от диссертации - прекрасная работа, чувствуется глубокое понимание автором всех аспектов исследования и огромный интерес к научному процессу по тематике диссертации, нечасто встречаются диссертации такого уровня.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные результаты диссертации.

Общее заключение.

Диссертационная работа Сульман А.М. 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 Сульман Александрины Михайловны, 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, ч. пр. Ленина, 92.
тел. (раб) +7(4872) 25 79 29
тел. (моб) +7(915) 783 80 13
E-mail: olgaponamoreva@mail.ru

26.02.2021 г

Понаморева Ольга Николаевна



Ольга Николаевна Понаморева
Заведующая кафедрой биотехнологии
ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»