

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертацию Стадольниковой Полины Юрьевны
«Разработка и исследование свойств нового биокатализатора на основе альгинатных
микросфер и глюкозооксидазы»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Актуальность темы диссертации. В последние годы исследования, связанные с разработкой, изучением и применением на практике различных иммобилизованных биокатализаторов, включая и подобные системы на основе иммобилизованных ферментов, продолжают довольно интенсивно развиваться, что обусловлено их высоким прикладным потенциалом. При этом, практически для всех указанных систем очень важными является учет влияния на биокаталитические и физико-химические параметры, а также эксплуатационные характеристики, как материала носителя для иммобилизации соответствующего фермента, формы самого биокатализатора (волокна, пленки, дисперсные частицы, объемные изделия), так и метода получения целевого «изделия», а также экономические аспекты процесса с использованием того или иного иммобилизованного биокатализатора. Это указывает на актуальность и научную значимость исследований подобных интересных (как с научной, так и с практической точек зрения) биотехнологических объектов вообще, и, в частности, тех конкретных систем, которым посвящена рецензируемая диссертация Стадольниковой П.Ю..

В частности, в работе диссертанта был получен и исследован иммобилизованный биокатализатор, представляющий собой фермент глюкозооксидазу, химически зафиксированную на микрогранулах кальций-альгинатного гидрогеля. Для демонстрации возможностей биотехнологического применения такой системы она была протестирована в качестве улучшителя качества теста, предназначенного для выпечки хлеба.

Автор рецензируемой работы вначале исследовал закономерности влияния различных факторов процесса на особенности формирования и физико-химические характеристики биополимерного носителя – Са-альгинатных микрогранул, образующихся в ходе ионотропного гелеобразования по механизму так называемого «внутреннего желирования», что в результате позволило выбрать наиболее оптимальные (с точки зрения диссертанта) условия получения таких микрогранул. Далее оптимизации было подвергнута собственно стадия ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы, начиная с химической модификации носителя его обработкой сначала водорастворимым карбодиимидом, а затем N-гидроксисукцинимидом, и далее присоединение фермента. Конечно, вызывает вопросы выбор такой «усложненной» схемы, поскольку достаточно было бы просто синтезировать производное ацилмочевины по карбоксильным группам альгината с последующей пришивкой белка по его аминок группам без получения промежуточного N-оксисукцинимидного активированного эфира. По-видимому, диссертант воспользовался почерпнутой из литературы методикой без ее критического анализа. Ход дальнейших этапов исследования диктовался задачами данной диссертационной работы и включал оценку каталитической активности иммобилизованной глюкозооксидазы, хранимость полученных препаратов и оценку возможности их использования в процедуре приготовления теста. В целом такую последовательность решаемых задач следует признать вполне логически обоснованной.

Новизна исследования и полученных результатов. Многие из полученных в работе Стадольниковой П.Ю. результатов являются новыми, представляющими интерес для

биотехнологов и для специалистов пищевых отраслей, имеющих дело с разработками и производством хлебо-булочных продуктов питания.

Диссертантом осуществлена ковалентная иммобилизация глюкозооксидазы на Са-альгинатных микрогранулах, процесс формирования которых и влияние различных факторов на свойства получаемых гелевых частиц достаточно подробно изучены и оптимизированы автором рецензируемой работы. В ходе этих исследований был выполнен удачный подбор стабилизатора исходных эмульсий вода-в-масле (микрокапли водного раствора альгината натрия в растительном масле), что далее позволило воспроизводимо получать партии гелевых микрочастиц, использованных для иммобилизации фермента. В качестве технического замечания здесь можно отметить факт излишнего увлечения диссертанта нелегко произносимым термином «сурфактант» для обозначения стабилизатора эмульсий вместо принятого в отечественной коллоидной химии термина поверхностно-активное вещество или кратко ПАВ.

В плане изучения свойств препаратов иммобилизованной глюкозооксидазы результаты полученные автором диссертации о повышении pH- и термостабильности иммобилизованного фермента также являются новыми и практически значимыми для такой системы.

В принципе, найденные диссертантом тенденции в отношении влияния условий получения препаратов иммобилизованной на альгинатных микрочастицах глюкозооксидазы на каталитические и эксплуатационные характеристики такого биокатализатора могут быть применены и к другим ферментам тоже. Особенно это касается случаев, где требуется либо многократное использование соответствующих иммобилизованных биокатализаторов, а не лишь их работа только в единичном цикле, как в рецензируемой диссертации, либо продолжительное функционирование иммобилизованного биокатализатора в проточном биореакторе.

В целом по своей направленности, объектам исследований и методологии выполненных экспериментов диссертационная работа Стадольниковой П.Ю. вполне соответствует специальности «Биотехнология» и, в то же время, является междисциплинарным исследованием с привлечением методологии полимерной науки, методов физико-химического и биохимического анализа, а также технологии хлебопечения. В этой связи, к очевидным заслугам диссертанта относится овладение указанными дисциплинами на уровне тех задач, которые стояли перед ним по ходу выполнения работы.

Собственно диссертация Стадольниковой П.Ю. построена по традиционной схеме и включает следующие разделы: введение (где автор формулирует цели и задачи исследования), литературный обзор, экспериментальную часть, обсуждение результатов работы, заключение и выводы, список используемых сокращений, перечень цитируемой литературы и приложения. Диссертация изложена на 135 страницах, содержит 34 рисунка и 10 таблиц; список цитируемой литературы включает 215 ссылок. При этом в качестве несомненного достоинства работы необходимо отметить тщательность оформления именно списка цитируемых источников.

Во введении диссертации Стадольниковой П.Ю. изложено обоснование актуальности темы диссертации и информация о ранее выполненных исследованиях в этой области, сформулированы цель и задачи работы, отмечена новизна полученных результатов, их теоретическая и практическая значимость, приведены выносимые на защиту основные положения, указаны сведения об апробации результатов и публикациях.

В литературном обзоре диссертант сначала излагает известные из публикаций данные из ранее опубликованных работ о химической структуре и свойствах альгиновой кислоты и ее солей, далее переходя к описанию и обсуждению известных из научно-

технической литературы подходах к получению гелевых систем на основе этого полисахарида и приемах формирования альгинатных микрочастиц, которые могли бы отвечать требованиям, предъявляемым к эффективным носителям иммобилизованных ферментов. Кроме того, литературный обзор рецензируемой диссертации включает небольшой раздел, посвященный получению, строению, каталитическим свойствам и возможностям биотехнологического применения глюкозооксидазы. В целом, такая структура литературного обзора вполне оправдана и хорошо согласуется с предметом собственного диссертационного исследования П.Ю.Стадольниковой. Тем не менее, в отношении этой главы диссертации можно сделать ряд замечаний.

Так, автор работы часто смешивает понятия полимерное вещество и тот или иной материал, сформированный на основе соответствующего макромолекулярного вещества, что, конечно не является синонимами. В тексте литературного обзора нередко встречаются терминологические неопределенности типа: «природные гидрогели» (что именно имеется в виду – не ясно), «биополимеров и их усовершенствованных композитов» (усовершенствованных в отношении чего?); «из-за специфических профилей (?) мономеров», «различные категории (?) молекулярной массы», «галогенидные частицы», «в химической, текстильной и других биотехнологических (?) отраслях» и др. В ряде случаев отсутствуют ссылки на источник информации, которая постулируется в тексте литературного обзора. Имеются стилистические шероховатости, опечатки и пропуски необходимых знаков препинания. Таким образом, текст данной главы кандидатской диссертации Стадольниковой П.Ю. можно охарактеризовать как, к сожалению, все-таки недостаточно тщательно вычитанный и отредактированный.

Экспериментальная часть рецензируемой диссертационной работы включает описание использованных веществ, методик проведения экспериментов, анализа физико-химических свойств и ферментативной активности полученных диссертантом препаратов иммобилизованной глюкозооксидазы, а также их испытания в качестве улучшителей свойств теста и выпеченного из него хлеба. В целом эта глава диссертации изложена вполне адекватно и дает возможность оценить как проводились эксперименты и насколько достоверны полученные результаты. Основное замечание рецензента к данному разделу работы относится к такому используемому автором показателю, как «Эффективность иммобилизации фермента», формула для расчета которого приведена на стр. 63 диссертации:

$$\text{Эффективность иммобилизации (\%)} = (C_{\text{исх.}GOx} - C_{\text{смыв.}GOx}) : C_{\text{исх.}GOx} \times 100\%$$

В этом случае полученное в конкретном опыте значение параметра эффективности будет являться только частным примером, относящимся только к одной конкретной исходной концентрации фермента, а при более высокой исходной концентрации вычисленная по этой формуле эффективность иммобилизации будет падать, в то время как при пониженной исходной концентрации, – напротив, возрастать, т.е. не будет являться универсальным показателем, характеризующим эффективность процесса независимо от содержания фермента в растворе, используемом для ковалентного присоединения глюкозооксидазы к альгинатному носителю.

Последующий раздел (глава) диссертации включает описание полученных автором работы результатов и их обсуждение. Эти данные свидетельствуют о довольно большом объеме экспериментальных исследований, выполненных Стадольниковой П.Ю., что является несомненным положительным качеством данной работы. Эта основная часть диссертации содержит данные об экспериментальном подборе и оптимизации методики приготовления Са-альгинатных микрогранул, изучения их свойств и морфологических особенностей, оптимизации условий химической модификации альгинатного носителя для

введения в его структуру N-оксисукцинимидных группировок, необходимых для ковалентного присоединения белковых макромолекул (в данном случае – фермента глюкозооксидазы), и осуществления собственно иммобилизации. Далее диссертант переходит к описанию и обсуждению результатов экспериментов по изучению каталитической активности иммобилизованного фермента, влияния на его активность pH среды и температуры реакции окисления глюкозы. Заключительная часть этой главы посвящена исследованиям возможности применения биокатализатора, полученного автором диссертации для улучшения хлебопекарных свойств хлебного теста.

Оценивая все эти данные, необходимо еще раз отметить большой объем выполненных Стадольниковой П.Ю. экспериментов с привлечением ряда современных информативных методов физико-химического и биохимического анализа, в частности, оптической и электронной микроскопии, инфракрасной Фурье-спектроскопии и УФ-спектроскопии, термогравиметрии, капиллярной вискозиметрии и др. Все это относится к положительным моментам.

В целом, обнаруженные автором работы особенности физико-химических свойств, микроструктуры и ферментативной активности полученного иммобилизованной глюкозооксидазы должны послужить научной основой и для получения новых иммобилизованных ферментных биокатализаторов с прогнозируемыми свойствами, наиболее подходящими для применения таких материалов в конкретных биотехнологических процессах.

Однако, у рецензента имеются и замечания, которые требуют разъяснений и уточнений со стороны автора диссертации. Вот некоторые лишь избранные примеры:

Стр.71: «Процедура не влияет на форму и морфологию частиц ... , однако увеличивает их размер вследствие набухания при процессе сшивки ...» - очень странное заключение, поскольку в ходе сшивки степень набухания, наоборот, снижается – чем сильнее сшита трехмерная полимерная сетки, тем ниже степень набухания гелевой системы.

Таблица 3.2: В таблице указан объем воды, добавляемой к эмульсии, а вот к какому объему эмульсии эта вода добавляется – не указано, поэтому значения гидромодуля не ясны.

Стр.82: «На рис.3.4 представлено изменение концентрации пероксида водорода при различном содержании EDC и NHS на 0.3 г альгината натрия в составе биокатализатора ...». Во-первых концентрация H_2O_2 определяется активностью фермента, а не «содержанием» EDC и NHS, а, во-вторых, в составе биокатализатора нет ни EDC, ни NHS, которые использовались только на стадии химической модификации носителя.

Стр.88: «Однако иммобилизация позволяет легко отделить фермент от реакционной среды и использовать его повторно, что компенсирует потерю активности при однократном использовании» - логика этой фразы вызывает большие сомнения, особенно учитывая всего лишь один цикл работы иммобилизованной глюкозооксидазы при обработке ею теста для последующей выпечки хлеба.

Стр.98: «Ферментативная обработка пшеничной муки – интересная альтернатива для изменения структуры теста и, как следствие, улучшение функциональных свойств муки.» - следствием изменения структуры теста никак не может быть улучшение функциональных свойств муки, т.е. того, из чего тесто уже получено.

Стр.99: «Образование дисульфидных и недисульфидных связей происходит за счет связывания двух остатков цистеина, которые находятся рядом в матрице пищевого белка». Совершенно непонятно что за недисульфидные связи образуются «за счет связывания двух остатков цистеина»? Эта фраза не имеет химического смысла.

Стр.107: «Объясняется это тем, что альгинат натрия представляет полимер, набухающий в водной среде и сохраняющий при этом сферическую форму ...» - при чем тут альгинат натрия и как он, т.е. вещество, может иметь сферическую форму?

Автореферат работы вполне описывает содержание диссертации, хотя некоторые неточности и опечатки из текста диссертации, к сожалению, свойственны и автореферату.

Однако, указанные замечания в основном имеют частный характер и не затрагивают оценок достоверности работы и ее ценности. Работа соответствует критериям п.7 паспорта специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Опубликованные диссертантом материалы, а именно 15 научных статей, из них 8 статей в научных журналах, включенных в перечень ВАК, и 6 тезисов докладов на научных конференциях, как и автореферат, отражают содержание работы.

Диссертационная работа Стадольниковой Полины Юрьевны является завершенной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных диссертантом исследований в области биотехнологии содержится решение научных и практических задач по получению нового иммобилизованного биокатализатора, изучению его свойств и оценки возможности применения в процессах, связанных с хлебопечением, что может быть использовано для развития научных основ биокатализа, а также биотехнологических процессов, относящихся к получению и применению на практике эффективных ферментных биокатализаторов.

Диссертация «Разработка и исследование свойств нового биокатализатора на основе альгинатных микросфер и глюкозооксидазы», соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пп.9-14 «Положения о присуждении научных степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (с изменениями и дополнениями от 26.09.2022), а автор работы Стадольникова Полина Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией криохимии (био)полимеров
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института элементоорганических соединений имени А.Н.Несмеянова
Российской академии наук (ИНЭОС РАН)
(119334, г. Москва, ул. Вавилова, 28, стр. 1;
(499) 135-92-02; larina@ineos.ac.ru, https://ineos.ac.ru),
д.х.н. (02.00.06 – Высокомолекулярные соединения (химические науки) и
03.01.06 – Биотехнология), профессор

Лозинский Владимир Иосифович

10.05.2023

Подпись В.И.Лозинского удостоверяю
Ученый секретарь ИНЭОС РАН
к.х.н.



Е.Н.Гулакова