

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию  
Стадольниковой Полины Юрьевны  
на тему: «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.** Диссертационная работа Стадольниковой П.Ю. представляет собой целостное научное исследование по разработке гетерогенных биокатализаторов на основе глюкозооксидазы и альгинатных микросфер, синтезированных методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования. В связи с междисциплинарным характером исследования, диссертантом для достижения поставленных целей решался ряд задач, в том числе: получение альгинатных микросфер методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования с последующим изучением их морфологии; модификация поверхности носителя для получения пригодных для ковалентной иммобилизации фермента функциональных групп; оценка эффективности иммобилизации глюкозооксидазы и определение физико-химических и каталитических характеристик полученного биокатализатора; исследование влияния полученного препарата на свойства теста из пшеничной муки.

При разработке современных технологий синтеза биологически активных соединений во всем мире активно используются ферменты – биологические катализаторы, что связано с их высокой каталитической эффективностью, специфичностью, обеспечением высоких выходов целевого вещества без образования побочных продуктов. Ферменты могут быть использованы как в свободном виде, так и в нерастворимой или иммобилизованной форме. В большинстве биокаталитических процессов иммобилизация биокатализатора на твердом нерастворимом носителе позволяет повысить его устойчивость к ингибирующим воздействиям (в том числе – рН и температуры), а также использовать препарат многократно за счет легкого отделения от реакционной среды.

Для иммобилизации ферментов используется ограниченное количество органических и неорганических носителей, к которым предъявляется ряд определенных требований. Перспективным типом носителей для связывания ферментов являются биополимеры, что обусловлено их способностью к гелеобразованию, наличием на поверхности реакционноспособных функциональных групп, практически полной биodeградируемостью и, соответственно, экологической безопасностью.

Актуальность данного направления исследований подтверждается десятками успешных трудов, посвященных носителям для иммобилизации на основе альгината натрия и опубликованных в ведущих рецензируемых научных журналах. В большинстве исследований иммобилизация ферментов на поверхность биополимеров осуществляется методом адсорбции, что существенно снижает эффективность процесса и увеличивает потерю фермента из-за недостаточно прочного закрепления на поверхности носителя. В отличие от физических методов образование новых ковалентных связей между ферментом и носителем обеспечивает прочную и необратимую связь. Одним из приёмов является сшивка аминокрупп фермента с активированными карбоксильными группами альгинатных микросфер, что способствует увеличению стабильности фермента, сохранению его активности в более широком диапазоне рН и температур, а также минимизации потерь белка при использовании биокатализатора.

В диссертационной работе Стадольниковой П.Ю. последовательно изучены аспекты и факторы, влияющие на эффективность ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы на поверхность альгинатных микросфер. Экспериментально подобраны оптимальная концентрация биополимера и основные условия получения гетерогенного биокатализатора. Получен биокатализатор, пригодный для применения в производстве пищевых продуктов.

Таким образом, тема диссертационной работы Стадольниковой Полины Юрьевны, безусловно, актуальна как с теоретической, так и с практической точек зрения. Цель и задачи работы, чётко сформулированы автором и соответствуют современным тенденциям развития биотехнологии.

**Научная новизна и практическая значимость исследований.** В диссертационной работе Стадольниковой П.Ю. представлены результаты, обладающие научной новизной и практической значимостью. Весьма интересны результаты исследования морфологии альгинатных микросфер, полученных методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования, а также их физико-химической модификации. Автором достаточно успешно проведена ковалентная пришивка глюкозооксидазы к поверхности альгинатных микросфер, что позволяет расширить сферы применения данного фермента, в том числе в пищевой отрасли. Полученный гетерогенный биокатализатор впервые использован для улучшения хлебопекарных свойств теста из пшеничной муки, что может в дальнейшем являться основой для разработки и внедрения в производство новой технологической добавки (хлебопекарного улучшителя).

**Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.** Обоснованность и достоверность полученных автором результатов подтверждена использованием современных физико-химических методов исследования, статистической оценкой полученных данных и их корректной и правильной интерпретацией. Методики, представленные в экспериментальной части надёжны и апробированы, а используемые в работе методы позволяют решать поставленные задачи. Результаты

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

**Рекомендации по использованию результатов диссертации.** Результаты диссертационного исследования Стадольниковой П.Ю. могут быть использованы в качестве теоретической и практической основы для создания высокоэффективных биокаталитических систем, перспективных для фармацевтической, пищевой, химической и других отраслей промышленности, а также аналитической химии.

**Краткая характеристика основного содержания диссертации.** Диссертационная работа Стадольниковой П.Ю. изложена на 135 страницах, включает 34 рисунка и 10 таблиц, список литературы содержит 215 наименований. Диссертация построена по классической схеме и состоит из обзора литературы; материалов и методов исследований; изложения полученных результатов; выводов; списка цитируемой литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность диссертационного исследования, формулирует цель работы и решаемые в ней задачи, выделяет научную новизну и практическую значимость. Диссертант доказывает целесообразность использования иммобилизации ферментов для повышения их операционной стабильности и возможности многократного использования. Автор подтверждает широкое использование биополимеров в качестве матриц для получения гетерогенных биокатализаторов, описывает преимущества одного из распространенных биополимеров – альгината натрия, а именно его невысокую стоимость, нетоксичность, способность к ионотропному гелеобразованию, наличие реакционноспособных групп, биосовместимость и биоразлагаемость.

Литературный обзор по теме диссертации (47 страниц) характеризуется глубоким анализом научных изысканий, проведенных ранее в данной области. Большая часть цитируемых в обзоре источников относится к периоду последних пяти лет, что доказывает несомненную актуальность проводимых исследований. Обзор литературных источников построен логично, большинство подразделов включает схемы и рисунки, что облегчает восприятие материала и акцентирует внимание на основных аспектах исследуемой тематики. Анализ литературных данных свидетельствует о перспективе применения в качестве носителей для иммобилизации ферментов класса оксидоредуктаз, в частности – глюкозооксидазы микрочастиц на основе альгината натрия. Опираясь на проведенный анализ диссертант обосновывает выбор направления исследований в заключении к Главе 1.

Во второй главе (10 страниц) автором подробно описаны следующие методики: синтез альгинатных микросфер методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования; иммобилизация глюкозооксидазы на поверхности микросфер; определение активности и стабильности нативных и иммобилизованных образцов фермента; изучение морфологии микрочастиц с помощью метода оптической микроскопии; физико-химическая характеристика альгината натрия, альгинатных микросфер и

синтезированного биокатализатора на их основе (инфракрасная спектроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, вискозиметрия); термогравиметрическое исследование; проведено испытание биокатализатора в качестве хлебопекарного улучшителя. Спектр методов, использованных в исследовании, свидетельствует о теоретической и экспериментальной компетентности соискателя и высоком уровне проведённых исследований.

В третьей главе (42 страницы) представлены результаты исследований альгинатных микросфер и биокатализатора на их основе.

Синтезирован новый гетерогенный биокатализатор на основе глюкозооксидазы посредством её ковалентной иммобилизации на поверхности альгинатных микросфер, полученных методом эмульгирования /внутреннего гелеобразования, с использованием карбодиимида и N-гидроксисукцинимиды в качестве активаторов поверхности носителя. Прочная сшивка фермента с матрицей происходила за счёт образования амидной связи, наличие которой подтверждалось инфракрасной Фурье-спектроскопией. Автором определена активность синтезированного биокатализатора в реакции окисления  $\beta$ -D-глюкозы глюкозооксидазой до D-глюконовой кислоты. Несмотря на то, что активность полученного препарата ниже, чем нативного, иммобилизация позволяет легко отделить биокатализатор от реакционной среды и при необходимости использовать его повторно. Автор показал существенное расширение рабочих диапазонов pH и температуры, иммобилизованной глюкозооксидазы, по сравнению с нативной. Полученный биокатализатор перспективен для практического применения в таких процессах, как получение глюконовой кислоты, определение концентрации глюкозы в биологических жидкостях, а также различных областях пищевой промышленности.

Несомненным преимуществом работы является изучение диссертантом возможности использования синтезированного биокатализатора в прикладном ключе. В качестве технологической модели выбран процесс хлебопечения. Для понимания происходящих внутри теста процессов и обеспечения безопасности готового продукта диссертант исследовал изменения в структуре биокатализатора при повышении температуры до 200 °C методом термогравиметрии. Пробная выпечка изделий с добавлением в тесто биокатализатора в качестве технологического улучшителя в определенных концентрациях показала, что это благоприятно отражается на хлебопекарных свойствах муки и органолептических показателях готового хлебобулочного изделия, способствует укреплению клейковины.

Таким образом, современными методами физико-химического анализа диссертантом получен большой массив экспериментальных данных, что позволило сделать грамотные выводы по результатам исследований, которые приведены в заключении диссертационной работы.

В заключении автором приведены аргументированные и обоснованные выводы по результатам исследовательской работы.

**Вопросы и замечания по работе.** В ходе анализа диссертационной работы Стадольниковой П.Ю. возникли некоторые вопросы и замечания:

1) Публикации автора диссертации в научных журналах «Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия» и «Научно-технический вестник Поволжья» входят в перечень, рекомендованный ВАК Минобрнауки РФ. Однако в связи с тем, что данные научные издания не относятся к научной специальности 1.5.6 Биотехнология в списке публикаций их рекомендуется приводить в разделе «В. Публикации в других изданиях».

2) Не мог бы автор пояснить по каким критериям осуществлялась статистическая обработка экспериментальных результатов в зависимости от объема исследуемой выборки. Диссертант указывает, что число вариантов, составляющих выборку для статистической обработки составило не менее 3. Однако рекомендуемое число независимых параллельных определений при проведении количественного анализа должно быть не менее 5. В таком случае возможно применять распределение Стьюдента, оценивать полуширину доверительного интервала и относительную ошибку среднего результата. В ином случае оценивают сходимость результатов определений. Кроме того, автор не указывает величину ошибки среднего результата, которая допустима в данном исследовании. Согласно данным таблицы 3.3 в ряде случаев погрешность достигает 50 %.

3) При описании перечня ингредиентов в рецептуре хлеба белого диссертант не уточняет сортность используемой пшеничной муки. Согласно ГОСТ 26987-86 «Хлеб белый из муки высшего, первого и второго сортов» для производства хлеба белого может быть использована мука пшеничная различных сортов. В свою очередь сортность муки влияет на исходное качество и количество клейковины, физико-химические показатели мякиша готового изделия и его органолептику. Соответственно и введение предложенного технологического улучшителя будет оказывать на изделие не одинаковое влияние. Кроме того, возникает вопрос почему готовые изделия не оценивались по стандартным физико-химическим показателям (кислотность, пористость, влажность), что возможно дало бы более полную информацию о влиянии биокатализатора на хлебобулочное изделие.

4) Почему при подборе соотношения вода/масло для последующего осаждения биополимерных частиц из масляной фазы (см. табл. 3.2) диссертант не оценивал объем добавляемой воды менее 150 мл?

Возникает также вопрос определял ли автор на данном этапе исследования процент осаждаемых микросфер?

5) Автор при оценке внешнего вида, размера микрочастиц альгината натрия, их морфологии и компоновки ссылается на данные оптической микроскопии, представленные на рисунках 3.2 и 3.3. Однако представленные иллюстрации мало информативны. Почему-то не приведены изображения микросфер, полученных при всех исследуемых концентрациях альгината натрия (2,5 %, 3,0 %). По представленным иллюстрациям нет возможности

объективно оценить деформацию микросфер и морщинистость их поверхности.

6) Автор не приводит данные по удельной активности глюкозооксидазы, в связи с чем затруднительно сравнивать некоторые показатели нативного и иммобилизованного препаратов глюкозооксидазы.

7) Мог бы диссертант объяснить с чем связано снижение рН стабильности иммобилизованного препарата глюкозооксидазы при значениях рН 4-5 в сравнении с нативным.

8) Автор приводит сравнительную характеристику образцов пробной выпечки в таблице 3.7. Однако, обобщающие выводы к данной части исследования не представлены, что затрудняет объективность оценки результатов.

9) При исследовании упруго-эластичных свойств клейковины от количества вносимого иммобилизованного препарата диссертантом не приводятся данные по влиянию нативного ферментного препарата на показатели клейковины. В связи с этим объективно оценивать влияние иммобилизованного препарата на качество теста не представляется возможным.

10) Автор делает заключение о благоприятном влиянии внесения биокатализатора в количестве от 25 до 50 мг на 225 г муки на хлебопекарные свойства муки и органолептические показатели готового изделия. Однако согласно данным таблицы 3.8 наилучшие показатели наблюдаются при введении в рецептуру 25 мг препарата. Увеличение количества биокатализатора до 50 мг не дает технологических преимуществ и экономически нецелесообразно.

11) В тексте диссертации встречаются стилистические неточности, ошибки и опечатки.

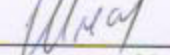
**Публикация основных результатов диссертации и соответствие автореферат положениям диссертации.** Основные результаты диссертации изложены в 8 публикациях в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных Scopus и Web of Science и в изданиях из рекомендуемого перечня ВАК Минобрнауки РФ. Высокий уровень изданий подтверждают научную новизну и практическую значимость полученных диссертантом результатов. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные результаты диссертации.

**Общее заключение.** Диссертационная работа Стадольниковой П.Ю. является завершенной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных диссертантом исследований в области химии и биотехнологии содержится решение научных и практических задачи по разработке и исследованию свойств гетерогенного биокатализатора на основе модифицированных альгинатных микросфер и глюкозооксидазы, который в свою очередь может быть использован для развития аналитической химии, пищевой промышленности, современных процессов получения биологически активных веществ.

Диссертационная работа, представленная к защите Стадольниковой Полиной Юрьевной, 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 1.5.6 Биотехнология, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология.

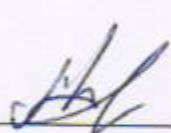
Официальный оппонент:

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

  
Шнайдер Ксения Леонидовна  
(специальность 02.00.15 - Катализ)

Подпись заверяю:

Начальник управления аттестации научных и научно-педагогических кадров  
ФГБОУ ВО «КНИТУ»

Л.З. Фатхуллина 

« 4 » май 2023 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

