

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Волокитиной Марии Владимировны “Хроматографические биокаталитические реакторы нового поколения на основе макропористых сорбентов монолитного типа“, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 02.00.06 – высокомолекулярные соединения

В настоящее время процессы ферментативного катализа очень широко используются в пищевой промышленности, фармацевтике, медицине, химической промышленности. В отличие от использования нативных ферментов, применение *гетерогенных биокатализаторов* является более экономичным и технологичным. Преимущества иммобилизованных ферментов связаны со стабилизацией ферментативной активности, возможностью многократного использования таких биокатализаторов, удешевлением и упрощением технологии за счет более эффективного выделения и очистки целевых продуктов, а также возможностью автоматизировать биотехнологические процессы. С целью замены традиционных колонок, упакованных гранулами сорбента, с начала 90-х годов разрабатываются биокатализаторы нового поколения на основе *макропористых полимерных материалов монолитного типа*. Это полимерные монолиты (стержень, диск или трубку), пронизанные сетью проточных каналов, или *макропор*, открытая структура которых обеспечивает минимальное сопротивление потоку подвижной фазы и, таким образом, преобладание конвективного механизма массопереноса над диффузионным. В связи с этим задача получения новых гидрофильных макропористых полимерных материалов монолитного типа с целью их использования для гетерогенного катализа, которая решается в диссертации автора, несомненно, является одной из приоритетных задач современной биотехнологии, в частности прикладной энзимологии.

Кроме того, создание методических тандемов, совмещающих химический и аналитический процессы, а в данном случае объединение хроматографического анализа продуктов с биокаталитическим процессом,

позволяет проводить *on-line* мониторинг протекания химических реакций. В ряде случаев такой подход позволяет исключить операции по очистке и выделению целевых продуктов, что способствует упрощению и удешевлению процесса..

Целью работы заключалась в разработке хроматографических реакторов, состоящих из биокаталитической и аналитической колонок на основе макропористых монолитных носителей.

Таким образом, **актуальность** данной диссертационной работы очевидна.

Научная новизна работы заключается в 1) разработке методов синтеза новых макропористых гидрофильных материалов на основе сополимеров глицидилметакрилата (ГМА), 2-гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА) с этиленгликольдиметакрилатом (ЭДМА), а также глицидилметакрилата (ГМА) и глицериндиметакрилатом (ГДМА) в форме монолитных колонок с контролируемой поровой структурой; 2) разработке метода иммобилизации ферментов с использованием макромолекулярного спейсера; 3) разработке хроматографических схем для анализа различных природных и синтетических полимеров (РНК, поли(цитидиловой кислоты), полимолочная кислота (ПМК), ксилана и продуктов их деградации); 4) разработке хроматографических реакторов, состоящих из биокаталитической и аналитической колонок, для решения некоторых биотехнологических задач, в частности, для очистки многокомпонентной смеси биомолекул от примесей РНК, а также получения ксилозы и ксилоолигосахаридов из древесного ксилана.

Практическая значимость работы состоит в том, что разработанные хроматографические методы могут быть предложены для высокоскоростного анализа и сепарации различных природных и синтетических полимеров, и, в частности РНК, поли(С), ксилана, полимолочной кислоты и продуктов их деградации. На основе полученных в работе результатов по характеристике макропористых монолитных материалов могут быть даны рекомендации для направленного контроля характеристик матриц, предназначенных для решения других конкретных биотехнологических

задач. Таким образом, **практическая ценность** работы также очевидна.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение), выводов и списка литературы, который включает 223 источника. Работа содержит 182 страницы печатного текста, включая 69 рисунков и 21 таблицу.

Литературный обзор состоит из 5 разделов и написан очень логично и грамотно, хорошим литературным языком, как, впрочем, и вся диссертация. Несмотря на сложность обсуждаемой проблемы, материал легко читается и усваивается, что позволяет следовать логике автора. В обзоре подробно описаны и проанализированы следующие аспекты, относящиеся к теме диссертации:

Раздел 1 посвящен полностью описанию ферментов как природных биокатализаторов, а также основ биокатализа (кинетика ферментативных реакций, определение параметров эффективности ферментативного катализа).

В Разделе 2 рассмотрены особенности гетерогенного биокатализа, способы иммобилизации и возможные носители для иммобилизации белков.

Раздел 3 посвящен аналитическому рассмотрению макропористых монолитных материалов как носителей для иммобилизации ферментов и стационарных фаз для ВЭЖХ, а также описанию основных методов синтеза и исследования материалов данного типа.

Раздел 4 посвящен анализу основных видов хроматографических реакторов, в частности реакторам, позволяющим комбинировать процессы биокатализа и сепарации.

В Разделе 5 автор анализирует литературу, в которой описаны гетерогенные биокатализаторы с использованием ферментов, использованных в диссертационной работе (рибонуклеаза А, ксиланолитические ферменты β -ксиланаза и β -ксилозидаза, эстераза).

К сожалению, подробно разобрав все доступные публикации по этим ферментам, автор не смог сделать заключение из литобзора, в котором следовало бы обобщить и четко сформулировать, почему на решении именно тех, а не каких-то других задач, должна быть сфокусирована его диссертационная работа.

В экспериментальной части очень тщательно и подробно описаны все реагенты и оборудование, использованное в работе. Также подробно описаны протоколы синтеза макропористых монолитных матриц для иммобилизации ферментов; методики для изучения свойств полученных монолитных матриц; методики иммобилизации ферментов на поверхности полимерного носителя (прямая ковалентная иммобилизация, с помощью полимерного спейсера); методы для определения количества иммобилизованного фермента; протоколы для определения кинетических параметров биокаталитических реакций; методы для off-line и on-line мониторинга образования продуктов деградации высокомолекулярных субстратов. В случае on-line мониторинга, это касается хроматографического реактора на основе рибонуклеазы А и реактора на основе комплекса ксиланолитических ферментов.

Главу Результаты и обсуждение представленной к защите диссертации отличают хорошая логика, аккуратность и последовательность в планировании и проведении экспериментов, а также тщательное обсуждение и глубокий анализ полученных автором результатов.

Глава Результаты и обсуждение состоит из следующих 6 разделов :

- 3.1. Получение макропористых монолитных носителей для иммобилизации ферментов.
- 3.2. Получение макропористых монолитных стационарных фаз для хроматографического анализа.
- 3.3. Иммобилизация ферментов на поверхности макропористых тных носителей.

3.4. Изучение влияния различных факторов на эффективность гетерогенного биокатализа.

3.5. Изучение деградации природных и синтетических полимеров с использованием разработанных гетерогенных биокатализаторов.

3.6. Разработка хроматографических биореакторов и изучение возможности их применения в различных процессах биотехнологии.

Что касается **списка использованных источников**, в работе приведен обширный список литературы из 223 ссылок. При этом количество относительно новых публикаций в этом списке составляет порядка 10-12 % (25 ссылок за последние 5 лет). Это свидетельствует, конечно, о большой глубине поиска, однако хотелось бы больше видеть ссылок на недавние статьи по теме диссертации. Возможно, список было бы лучше немного сократить, а долю новых ссылок в нем увеличить.

По работе может быть сделан ряд замечаний:

1. На мой взгляд, очень “широко” сформулирована цель работы. Было бы, вероятно, лучше сформулировать ее более конкретно, в частности можно было бы указать, какие, например, ферменты (или класс ферментов), будут использованы в работе, какие полимеры (какого класса) будут применены для создания монолитных колонок, для каких процессов будут использованы хроматографические биореакторы и т.д. Тогда было бы легче понять, что именно сделано автором, а что другими исследователями.

2. Автореферат оформлен не по стандартам ВАК (шрифт должен быть 14, а интервал 1.5).

3. Подписи к осям практически во всех рисунках автореферате просто не читаются (слишком мелкий шрифт). Также не читаются зашифрованные “двухуровневые” названия всех образцов (см Табл 1, Табл 2).

4. Автор не умеет давать сокращения (замечание относится как к автореферату, так и к диссертации). Так, например, многократно

повторяются длинные названия полимеров и практически в каждом новом абзаце текста даются сокращения, уже ранее введенные автором в текст. Нет списка сокращений в автореферате, который мог бы решить эту задачу и сократить объем текста автореферата. Кроме того, существуют общепринятые сокращения, например, БК (биокатализатор). ИмБК – иммобилизованный биокатализатор, ИмФ-иммобилизованный фермент, которые автор также не использует и которые также помогли бы решить задачу сокращения текста.

5. В тексте много лишних слов (температура, диаметр, хроматографический сорбент, полученный, использованный; «синтетический полимер, а именно окисленный полимер» (см 3.3 стр 10 автореферата), количественное содержание фермента (стр 11 автореферата), а также повторяющихся предложений и даже абзацев.

Так, на стр 8 (3.1) автореферата написано, что синтез **всех** сополимеров проводили методом свободнорадикальной полимеризации в колонках-картриджах из нержавеющей стали диаметром 4.6 и длиной 50 мм. В качестве инициатора использовали АИБН. На стр. 9 (3.2) весь абзац полностью повторяется для сополимера ЛМА-ЭДМА.

6. Часы (ч), минут (мин) грамм (г) в тексте написаны полностью, а должны быть даны как «ч», «мин», «г».

7. Автор на рис 5 (автореферата) приводит схемы двух методов иммобилизации (А и Б), но далее не пользуется простым приемом (метод А, метод Б), а много раз в тексте повторяет "многостадийный метод через спейсер".

8. Названия полученных образцов (см.Таблицу 1, стр. 8 автореферата) нигде не расшифрованы и понять, что они означают практически невозможно. То же самое можно отнести к Таблице 2 (стр. 11), где понять логику названия образцов (КР1, ДР1 для рибонуклеазы А), КК1; КК2 (для бета-ксилозидазы) КК3; ДК4 (для бета-ксиланазы) и ЭД1 (для эстеразы) тоже сложно. То, что К – колонка, а Д- диск удастся обнаружить только после прочтения еще 2 стр. На стр. 13 автор наконец сообщает, что «для сравнения влияния геометрии стационарной фазы на эффективность

гетерогенного биокатализа в работе также были использованы макропористые монолитные диски....», при этом ни сокращение Д (для дисков), ни сокращения К (для колонок) автор так нигде и не вводит.

Вместе с тем приятно отметить, что автору практически удалось избежать опечаток и стилистических ошибок при оформлении как диссертации, так и реферата, что бывает крайне редко и свидетельствует о безупречной грамотности и пунктуальности автора.

Все высказанные соображения и замечания не имеют принципиального значения и носят чисто дискуссионный характер.

Диссертационная работа Волокитиной Марии Владимировны прекрасно проиллюстрирована большим количеством рисунков и таблиц, в целом диссертация оставляет приятное впечатление.

Из работы видно, что автором выполнен очень большой объем исследований с использованием самых современных физико-химических методов.

Заключение

Диссертационная работа Волокитиной Марии Владимировны представляет собой научно-квалификационную работу, в которой на основании выполненных автором исследований решена задача разработки хроматографических реакторов, состоящих из биокаталитической и аналитической колонок на основе макропористых монолитных носителей. Полученные в диссертационной работе научные результаты и практические разработки имеют существенное значение для развития важных областей биотехнологии. Диссертационная работа полностью соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям п.7 Положения о порядке присуждения ученых степеней, а ее автор Волокитина Мария Владимировна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 –

биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 02.00.06 –
высокомолекулярные соединения.

ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
д.х.н.

Марквичева 10.02.2016 г.

Е.А. Марквичева

подпись Марквичевой Е.А. удостоверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН, д.ф-м.н.

Олейников В.А.



Сведения об официальном оппоненте по диссертации Волокитиной Марии Владимировны на тему:

«Хроматографические биокаталитические реакторы нового поколения на основе макропористых сорбентов молибдитного типа»,
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 02.00.06 – высокомолекулярные соединения».

| Фамилия, имя, отчество | Гражданство | Место основной работы, должность | Ученая степень, звание | Шифр специальности | Основные научные труды |
|------------------------------|----------------------|---|------------------------|--------------------|---|
| Марквичева Елена Арнольдовна | Российская Федерация | Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков Шемякина и Ю.А. Овчинникова вед. науч. сотр. Лаборатории полимеров для биологии | доктор химических наук | 03.00.04 Биохимия | <p>1. Tsoy A.M., Zaytseva-Zotova D.S., Edelweiss E.F., Bartkowiak A., Goergen J-L., Vodovozova E.L. and Markvicheva E.A. Microencapsulated multicellular tumor spheroids: preparation and use as a novel in vitro model for drug screening. <i>Biochemistry (Moscow) Supplement Series В Biomedical Chemistry</i> 2010, 4 (3):243-250.</p> <p>2. Суханова Т.В., Прудченко И.А., Ефремов Е.С., Угланова С.В., Филатова Л.Ю., Марквичева Е.А., Клячко Н.Л., Биомолекулы в коллоидных наноконтейнерах для доставки лекарств: включение и свойства дельта-сон индуцирующего пептида, <i>Вестн. Моск. Ун-та, сер. 2 Химия</i>, 2010, 51 (3): 209-214.</p> <p>3. Zaytseva-Zotova D., Valysheva V., Tsoy A., Drozdova M., Akorova T., Vladimirov L., Chevalot I., Marc A., Goergen J-L., Markvicheva E. Biocompatible Smart Microcapsules Based on Chitosan-Poly(Vinyl Alcohol) Copolymers for Cultivation of Animal Cells, <i>Advanced Engineering Materials</i>, 2011, 13 (12): B493-500.</p> <p>4. Zaytseva-Zotova D., Udartseva O., Andreeva E., Bartkowiak A., Bezdehaia L., Guillemain F., Goergen J-L., Markvicheva E. Polyelectrolyte microcapsules with entrapped multicellular tumor spheroids as a novel tool</p> |

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|---|
| | | | | | <p>to study the effects of photodynamic therapy, <i>Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials</i>, 2011, 97B (2) : 255–262.</p> <p>5. Borodina T., Grigoriev D., Markvicheva E., Mohwald H., Shehakin D. Vitamin E Microspheres Embedded Within a Biocompatible Film for Planar Delivery, <i>Advanced Engineering Materials</i>, 2011, ·13 (3):B123–B130.</p> <p>6. Sukhanova T.V., Artyukhov A.A., Prudchenko I.A., Golunova A.C., Semenikhina M.A., Shilman M.I., Markvicheva E.A., Entrapment and In Vitro Release of Delta-Sleep Inducing Peptide from Polymer Hydrogels Based on Modified Polyvinyl Alcohol, <i>Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry</i>, 2012, 6, 2: 149–155.</p> <p>7. Demina T., Zaytseva-Zotova D., Yablokov M., Gilman A., Akorova T., Markvicheva E., Zelenetskii A., DC Discharge Plasma Modification of Chitosan/Gelatin/PLLA Films: Surface Properties, Chemical Structure and Cell Affinity, <i>Surface & Coatings Technology</i>, 2012, 207: 508-516.</p> <p>8. Балышева В.И., Белов С.Ю., Власова Н.Н., Капустина О.В., Селина О.Е., Имятлин И.Р., Марквичева Е.А., Изучение иммунного ответа при иммунизации мышцей рекомбинантными плазмидами, включенными в биодеградируемые микрокапсулы, <i>Биотехнология</i>, 2013, 5 : 71-77.</p> <p>9. Sukhanova T.M., Artyukhov A.A., Gurevich Y.M., Semenikhina M.A., Prudchenko I.A., Shilman M.I., Markvicheva E.A., Delta-sleep inducing peptide entrapment in the charged macroporous matrices, <i>Water Sci Eng C</i>, 2014, 42: 461-465.</p> <p>10. Privvalova A., Markvicheva E., Sevvin C., Drozdova M., Kottgen C., Gilbert B., Ortiz M., Grandfils Ch., <i>Biodegradable polyester-based microcarriers with</i></p> |
|--|--|--|--|--|---|

| | | | | |
|--|--|--|--|---|
| | | | | <p>modified surface tailored for tissue engineering, J Biomedical Mater Research Part B, 2015, 103(3):939-48.</p> <p>11. Privalova A.M., Uglanova, S.V., Kuznetsova N. R., Klyachko N.L., Golovin Y. I., Korotkov V.V., Vodolozova E.L., Markvicheva E. A., Microencapsulated Multicellular Tumor Spheroids as a Tool to test Novel Anticancer Nanosized Drug Delivery Systems in Vitro, J Nanoscience Nanotechnology, 2015, 15(7) : 4806-4814.</p> |
|--|--|--|--|---|

Ведущий научный сотрудник лаборатории полимеров для биологии

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Тел. (495) 336-06-00

е-mail: lemark@ibch.ru

д.х.н.



Марквичева Елена Арнольдовна

Ученый секретарь ИБХ РАН

д. ф-м. н.




Олейников Владимир Александрович