

## ОТЗЫВ

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

Проблема оптимизации биокаталитических процессов не теряет актуальности уже на протяжении нескольких десятков лет. Это связано с тем, что использование ферментов, иммобилизованных на традиционных гидрогелевых носителях, сопряжено с деформацией биокатализатора, что в конечном итоге требует его частой замены. Эта проблема в значительной мере решается, если в качестве носителя использовать монолитные колонки из носителя, представляющего собой сшитый не набухающий в элюенте полимер с макроскопическими порами. В литературе описан целый ряд удачных примеров применения этого подхода для создания промышленных биокатализаторов в виде колонок или таблеток (дисков) с иммобилизованным ферментом. Очевидным преимуществом таких материалов является их механическая стабильность и возможность проведения реакции при высоком давлении и скорости подачи растворителя.

Исследования, направленные на создание монолитных носителей для хроматографии, ведутся под руководством проф. Т.Б. Тенниковой в лаборатории Полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии Института высокомолекулярных соединений уже около двух десятков лет, и рецензируемая диссертационная работа является важным этапом в этих исследованиях. Несмотря на то, что общая методология получения макропористых полимерных материалов была разработана в 90-х годах прошлого века, исследования по созданию биокатализаторов на основе макропористых монолитных носителей не теряют актуальности и в настоящее время. При этом большинство существовавших ранее монолитных биореакторов были предназначены для проведения реакций с участием низкомолекулярных субстратов. Автором настоящей работы был сделан следующий шаг: были получены монолитные макропористые сорбенты с порами размером порядка нескольких микрон, т.е. настолько крупными, что при нанесении на такие колонки полимерных субстратов не могут возникать диффузионные ограничения, и массоперенос в основном определяется конвекционными потоками.

Работа построена традиционным образом: она состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов и обсуждения и выводов. Работа имеет довольно значительный объем – 182 стр., причем список цитированной литературы включает 223 литературных источника. Все это говорит о глубокой проработке диссертантом исследуемой тематики.

Обзор литературы в работе имеет очень большой объем - он занимает около 70 страниц и состоит из 5 частей. Первая часть, имеющая, скорее, общеобразовательный характер, посвящена структуре ферментов и основам ферментативного катализа. Во второй части обзора автор также останавливается на общеизвестных с 70-х годов способах иммобилизации ферментов. Однако в этой главе также приводятся данные последних лет по иммобилизации ферментов на монолитных носителях. В третьей главе автор описывает способы получения и особенности поведения монолитных макропористых носителей, причем большое внимание уделено порогенам, т.е. со-растворителям, добавляемым к полимеризационной смеси, и служащим осадителями для образующегося полимера. В этой главе автор раскрывает имеющиеся представления о зависимости поровой структуры носителя от содержания и природы порога в полимеризационной смеси. Четвертая часть посвящена обзору технологических решений тандемных устройств, способных одновременно осуществлять ферментативную реакцию и контролировать выход и чистоту конечного продукта хроматографическим методом. Наконец, в последней части обзора приводятся основные данные по структуре и ферментативным свойствам четырех ферментов – рибонуклеазе,  $\beta$ -ксилазазе,  $\beta$ -ксилозидазе и эстеразе. В целом, обзор литературы написан хорошо и содержит основные сведения об описанных в литературе подходах к получению пористых монолитных носителей и биокатализаторов на их основе.

Экспериментальная часть диссертационной работы содержит детальное описание методик получения монолитных носителей и иммобилизации на них ферментов. Особое внимание уделено методикам определения активности ферментов в растворе и гетерогенных катализаторов на их основе. При этом в ряде случаев в работе были использованы различные методы определения активности одного и того же фермента. Энзимологическая часть методов написана настолько подробно, что по ней можно воспроизвести каждую из предложенных методик.

Глава результатов начинается с разделов, посвященных получению и характеристике монолитных макропористых носителей для иммобилизации ферментов и хроматографического разделения продуктов ферментативной реакции. В основе получения таких носителей лежит подход, основанный на том, что термодинамическая совместимость высокомолекулярных соединений с растворителями может сильно отличаться от таковой для мономеров. Поэтому по мере роста цепи в ходе полимеризационной реакции растворитель, являющийся осадителем для формирующегося высокомолекулярного соединения, вытесняется из раствора полимера в мономерной смеси. В результате в массе полимера образуются каналы, обеспечивающие протекание колонки при приложении внешнего гидростатического давления.

Существенной особенностью всех полученных в работе материалов является чрезвычайно высокая доля сшивателя (40%) в составе мономерной смеси, что делает образующийся носитель практически неспособным к набуханию в растворителях. Этой особенностью также определяется высокая механическая прочность получаемых носителей, поскольку все материалы представляют собой недеформируемую трехмерную макромолекулярную сетку.

Все полученные в работе материалы охарактеризованы по их проницаемости, общему количеству пор в носителе (пористость, в %) и среднему размеру пор. Для некоторых образцов был применен метод интрузионной ртутной порометрии, позволяющий получить информацию о распределении пор по размерам. Интересно, что этот метод выявил, что получаемые в работе носители характеризуются исключительно узким распределением пор по размерам, и разброс ширины пор не превышает нескольких раз.

Важная информация о полученных носителях была также получена методом сканирующей растровой электронной микроскопии. Оказалось, что этим методом удастся выявить отдельные полимерные клубки, формирующиеся в ходе полимеризации, соединенные бифункциональным сшивателем в гроздь. При этом автору удалось обнаружить, что состав смеси порогенов сильно влияет не только на общую пористость носителя, но также увеличивает размер полимерных клубков. На мой взгляд, это важное наблюдение может быть использовано для более глубокого понимания механизмов формирования макропористых монолитных материалов при полимеризации в присутствии растворителей, вызывающих фазовое расслоение в макромолекулярной системе.

Третья часть главы результатов посвящена иммобилизации ферментов на получаемых макропористых монолитных сорбентах. В данной главе автор, во-первых, воспользовался традиционным подходом, основанным на реакции белков с эпоксидными группами, содержащимися на поверхности носителя, а во-вторых, использовал подход, основанный на присоединении белков через длинную развязку. В качестве такой развязки была использована поли-(2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкоза), окисленная периодатом натрия и содержащая поэтому альдегидные группы. Для присоединения этого полимера к носителю эпоксидные группы раскрывали реакцией с аммиаком, после чего присоединяли к носителю полимер с альдегидными группами и далее пришивали к свободным альдегидным группам ферменты с образованием альдиминовых связей, которые затем восстанавливали боргидридом натрия. Сравнение эффективных значений каталитической константы и константы Михаэлиса рибонуклеазы, иммобилизованной на носителе напрямую и через полимерную развязку, выявило небольшое увеличение эффективности

катализа во втором случае. По всей видимости, это объясняется уменьшением константы Михаэлиса фермента, присоединенного к носителю через гибкую полимерную развязку.

Интересные результаты были получены автором при исследовании влияния формы полимерного биокатализатора на его активность. Оказалось, что более эффективный массоперенос, достигаемый в носителях, изготовленных в форме дисков, приводит к заметному повышению эффективности биокатализатора. К аналогичному результату приводит и увеличение скорости потока субстрата через биокатализатор.

Увеличение активности иммобилизованного фермента достигалось также при частичной замене глицидилметакрилата на гидроксиэтилметакрилат. Авторы приписывают этот эффект увеличению гидрофильности поверхности носителя, хотя, на мой взгляд, эти изменения могут быть вызваны и другими причинами.

Интересно, что повышение содержания фермента на носителе не приводило к существенному изменению эффективности биокатализатора. На мой взгляд, этот результат указывает на большое значение процессов массопереноса в пористых биокатализаторах.

В большинстве ранее опубликованных работ по использованию биокатализаторов на основе пористых монолитных носителей рассматривались ферментативные реакции с участием низкомолекулярных субстратов. В рецензируемой работе были получены макропористые носители, хорошо проницаемые для высокомолекулярных субстратов, таких как РНК, ксилан или полимолочная кислота. При этом были налажены системы проведения биокаталитического процесса, сопряженного с непрерывным мониторингом количества продуктов. Этот результат без сомнения является существенным методическим достижением и может в дальнейшем использоваться для создания промышленных биотехнологических установок.

В целом работа производит приятное впечатление, однако при ее прочтении возникает ряд вопросов и замечаний.

1. На протяжении всей работы автор утверждает, что в получаемых биокатализаторах на основе монолитных макропористых материалов отсутствуют диффузионные ограничения. Между тем результаты, излагаемые в разделах 3.4.4. и 3.4.5. приводятся данные, однозначно указывающие на зависимость каталитических параметров полученных материалов от скорости потока. Возникают сомнения в том, что максимальные скорости и константы Михаэлиса, определенные для полученных биокатализаторов, свободны от влияния массопереноса. Желательно было бы привести ясные доказательства отсутствия диффузионных ограничений в макропористых монолитных колонках.

2. Для определения каталитической константы всех исследованных ферментов недостаточно знать их максимальную скорость и концентрацию, поскольку неизвестно содержание активного фермента в исходном и иммобилизованном препарате. Для многих ферментов, в том числе для эстераз, разработаны методы титрования активных центров. Лишь зная содержание активных центров, можно определять каталитическую константу из максимальной скорости. Если же нет возможности измерить количество активных центров в образце, следует приводить данные о максимальной скорости при данной концентрации фермента.

3. Несмотря на то, что автор очень подробно характеризует пористость всех полученных носителей, в методической части отсутствуют протоколы определения проницаемости, пористости и среднего объема пор. Сказано лишь, что эти параметры определялись по уравнениям 20-22, приведенным в обзоре литературы. Хотя, по всей видимости, эти методы широко известны специалистам по созданию хроматографических носителей, было бы весьма полезно привести более подробные протоколы измерения проницаемости и размера пор в методической части.

3. Основной мономер, присутствующий во всех исследованных сорбентах – глицидилметакрилат. Известно, что эпоксидные группы очень медленно гидролизуются в воде при нейтральном рН, однако этот гидролиз все же происходит с конечной скоростью. Этот вопрос вообще не обсуждается в работе, так что создается впечатление, что эпоксидные группы на носителе практически «вечно» на нем остаются. Проверялся ли состав носителя с помощью ИК- или ЯМР-спектров через некоторое время после их получения.

4. Еще один вопрос касается иммобилизации ферментов на носителе через альдегид-содержащий полимер, выступающий в качестве гибкой развязки. Не очень понятно, почему при раскрытии 25% эпоксидных групп на носителе аммиаком фермент не может присоединяться к оставшимся 75% после обработки носителя альдегид-содержащим полимером. Как это было доказано? Не может ли частичная инактивация фермента на эпоксидном носителе быть вызвана многоточечной пришивкой, а не гидрофобностью полимерной матрицы. Наконец, не может ли объемный полимерный спейсер вызывать дополнительные затруднения при массопереносе в порах монолитного сорбента.

5. К сожалению, я не нашел в работе данных о количестве оставшихся после окончания полимеризации метакриловых двойных связей. Эти группы, во-первых, могут выступать в качестве электрофильного компонента в реакции присоединения по Михаэлю (реакция с сильными нуклеофилами - амино или сульфгидрильными группами), которое происходит в нейтральной среде при комнатной температуре. С другой стороны, эта

реакция может происходить с субстратами или компонентами смеси, в которой наносится субстрат. Например,  $\beta$ -меркаптоэтанол, трис-(гидрокси метиламинометан) или глицин могут легко вступать в реакцию, модифицируя поверхность сорбента. Те же самые вещества могут реагировать и с эпоксидными группами. Надо ли контролировать эти процессы при эксплуатации полученных в работе сорбентов?

6. На большинстве графиков отсутствуют доверительные интервалы. Какие были стандартные ошибки при измерениях каталитических параметров полученных в работе биокатализаторов?

Отмеченные недостатки не снижают общего благоприятного впечатления от диссертационной работы Волокитиной Марии Владимировны на тему: «Хроматографические биокаталитические реакторы нового поколения на основе макропористых сорбентов монолитного типа», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 02.00.06 – высокомолекулярные соединения. Данная работа является цельной законченной научно-квалификационной работой, которая по своему содержанию, уровню проведенных исследований, актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости в полной мере отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 24.09.13 № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, поскольку в ней предложено решение задач, имеющих существенное значение для исследований в области биотехнологии и химии высокомолекулярных соединений, а именно: разработаны протоколы получения новых макропористых полиметакрилатных материалов-носителей для иммобилизации ферментов в форме монолитных колонок с заданными поровыми характеристиками; предложен оптимальный метод иммобилизации ферментов на поверхности макропористых монолитных носителей, способствующий закреплению ферментов на поверхности матрицы в наиболее активной конформации; а также разработаны хроматографические биокаталитические реакторы, показана их высокая стабильность и эффективность в процессах деструкции как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных субстратов. Результаты исследования имеют как фундаментальное, так и практическое значение.

Выводы сформулированы четко и подтверждены экспериментальным материалом. Автореферат диссертации правильно и полно отражает содержание диссертации. Основные положения работы, излагаемые в диссертации, отражены в научных публикациях в отечественных и зарубежных журналах, содержащихся в списке, одобренном ВАК.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник



лаборатории функциональных полимеров и полимерных материалов, д.х.н.

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

Подпись Мелик-Нубарова Н.С.. заверяю

декан Химического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова,

академик



Дата 12 февраля 2016

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений.

119991 Москва, ул. Ленинские горы дом 1, стр. 3, Химический факультет.

Тел. (495)939-31-27

e-mail: [melik.nubarov@genebee.msu.ru](mailto:melik.nubarov@genebee.msu.ru)

## СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации Волокитиной Марии Владимировны на тему «Хроматографические биокаталитические реакторы нового поколения на основе макропористых сорбентов монолитного типа», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 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
Мелик-Нубаров Николай Сергеевич	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»  Химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений, лаборатория функциональных полимеров и полимерных	Доктор химических наук	02.00.06 - Высокомолекулярные соединения8	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Maximova, E.D., Zhiryakova, M.V., Faizuloev, E.B., Nikonova A.A., Kotova S.L., Solov'eva A.B., Izumrudov V.A., Litmanovich E.A., Kudryashova E.V., Melik-Nubarov N.S. Cross-linking as a tool for enhancement of transfection efficiency of cationic vectors Eur.Polymer J. 69 (2015) 110–120.</li> <li>2. Izumrudov V.A., Zhiryakova M.V., Melik-Nubarov N.S. Supercharged pyridinium polycations and polyelectrolyte complexes. Eur. Polymer J. 69 (2015) 121–131.</li> <li>3. Maximova E.D., Zhiryakova M.V., Faizuloev E.B., Nikonova A.A., Ezhov A.A., Izumrudov V.A., Orlov V.N., Grozdova I.D., Melik-Nubarov N.S. Cationic nanogels as Trojan carriers for disruption of endosomes Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 136 (2015) 981–988.</li> <li>4. Zhiyentayev T.M., Boltaev U.T., Solov'eva A.B., Aksenova N.A., Glagolev N.N., Chernjak A.V., Melik-Nubarov N.S. Complexes of Chlorin e6 with Pluronic and Polyvinylpyrrolidone: Structure and Photodynamic Activity in Cell Culture.</li> </ol>



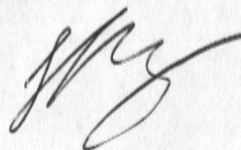
материалов.

- Photochem Photobiol. 90 (2014) 171–182.
5. Tsvetkov, Vladimir B.; Solov'eva, Anna B.; Melik-Nubarov, Nickolay S. Computer modeling of the complexes of Chlorin e6 with amphiphilic polymers Phys. Chem. Chem. Phys. 16, № 22, 10903-10913.
6. Demina T.V., Budkina O.A., Badun G.A., Melik-Nubarov N.S., Frey H., Müller S.S., Nieberle J., Grozdova I.D. Cytotoxicity and chemosensitizing activity of amphiphilic poly(glycerol)-poly(alkylene oxide) block copolymers. Biomacromolecules. 15 (2014) 2672-2681.
7. Yaroslavov A.A., Sybachin A.V., Zaborova O.V., Pergushov D.V., Zezin A.B., Melik-Nubarov N.S., Plamper F.A., Müller A.H., Menger F.M. Electrostatically Driven Complexation of Liposomes with a Star-Shaped Polyelectrolyte to Low-Toxicity Multi-Liposomal Assemblies. Macromol Biosci. 14 (2014) 491-495.
8. Berkovich A.K., Lukashev E.P., Melik-Nubarov N.S. Dipole potential as a driving force for the membrane insertion of polyacrylic acid in slightly acidic milieu. Biochim. Biophys. Acta. 1818 (2012) 375-383.
9. Krasnikov BF, Melik-Nubarov NS, Zorova LD, Kuzminova AE, Isaev NK, Cooper AJ, Zorov DB. Synthetic and natural polyanions induce cytochrome c release from mitochondria in vitro and in situ. Am J. Physiol. Cell Physiol. 300 (2011) 1193-1203.
10. Maksimova E.D., Faizuloev E.B., Izumrudov V.A., Litmanovich E.A., Melik-Nubarov N.S. Synthesis of Poly(N,N-dimethylaminoethyl

				11. Нам Е. В., Жирнов А. Е., Литманович Е. А., Мелик-Нубаров Н. С., Гроздова И. Д. Влияние модификации флуоресцентными группами на физико-химические свойства полиалкиленоксидов. Высокомолек. Соед. (А) 52 (2010) 1578–1584.
--	--	--	--	---

Ведущий научный сотрудник лаборатории функциональных полимеров и полимерных материалов, д.х.н.

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич



Подпись Мелик-Нубарова Н.С.. заверяю  
декан Химического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова,  
академик



В.В. Лунин/

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений. 119991 Москва, ул. Ленинские горы дом 1, стр. 3, Химический факультет. Тел. (495)939-31-27 e-mail: [melik.nubarov@genebee.msu.ru](mailto:melik.nubarov@genebee.msu.ru)