

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации
(ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России)
197376, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А
Тел.: (812) 234-57-29; факс: (812) 234-60-44
E-mail: info @pharminnotech.com
ОКПО 00481985, ОГРН 1037828029007
ИНН 7813045875

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии» Минздрава России
д.ф.н., профессор

И. А. Наркевич

№

На № 1631/104-03 от 22 декабря 2015 г.

«16» января 2016 года

(место для гербовой печати)

ОТЗЫВ

**ведущей организации на диссертационную работу
Волокитиной Марии Владимировны «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
в диссертационный совет Д. 501.001.59, созданный на базе Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова**

В последние десятилетия существенно возросла роль природных биокатализаторов для решения ряда научных и практических задач. Использование ферментов в производственных процессах, например, замена кислотного и щелочного гидролиза на ферментативный, позволяет исключить из технологического цикла вредные с экологической точки зрения химические реагенты, повысить чистоту и выход целевого продукта. Но использование свободных ферментов имеет ряд существенных недостатков, таких как высокая стоимость природных биокатализаторов и трудности в удалении их из реакционной среды. Кроме того молекулы ферментов достаточно чувствительны к температуре, pH и наличию различных веществ в реакционной среде. Действие данных факторов часто приводит к денатурации белковой молекулы и, как следствие, к потере активности фермента. В связи с этим разработка гетерогенных биокатализаторов является весьма важной задачей, имеющей фундаментальное и практическое значение.

Однако использование известных методов иммобилизации на стандартные носители, упакованные в колонки, не всегда обеспечивает необходимую эффективность биокатализа, что главным образом связано с диффузионными затруднениями при массопереносе субстрата к активному центру локализованного фермента. Как следствие, при высоких скоростях подачи раствора субстрата гетерогенные биокатализаторы часто работают в неравновесном и невыгодном для практики динамическом режиме. Преодолеть эти затруднения, которые резко ограничивают применение иммобилизованных ферментов, возможно при использовании в качестве носителей современных полимерных материалов на основе макропористых монолитных сорбентов.

Кроме того, чрезвычайно актуальным в современной биотехнологии является создание систем on-line мониторинга биокаталитических реакций, то есть тандемных хроматографических реакторов, состоящих из биокаталитической и аналитической частей.

В свете вышесказанного, диссертационная работа Волокитиной М.В., посвященная разработке комбинированных хроматографических биореакторов, состоящих из биокаталитической и аналитической колонок на основе макропористых монолитных носителей, является **актуальной и практически значимой**.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ИВС РАН по теме №1 "Биологически активные полимеры и материалы на их основе для биомедицинских целей". № гос. регистрации 01201372562.

В своей работе диссертант решал следующие задачи: получение новых макропористых полиметакрилатных материалов в форме монолитных колонок с контролируемой поровой структурой; разработка метода иммобилизации ферментов на поверхности макропористых полимерных монолитных носителей; изучение влияния условий проведения гетерогенного биокатализа; разработка методов ВЭЖХ-мониторинга продуктов ферментативного гидролиза высокомолекулярных субстратов с использованием в качестве стационарных фаз макропористых монолитных сорбентов; оценка перспективности использования полученных гетерогенных биокатализаторов в реакциях деградации природных и синтетических полимеров; создание хроматографических реакторов на основе макропористых монолитных носителей и апробация их в биотехнологических процессах.

Диссертационная работа Волокитиной М.В. построена по традиционной схеме. Она состоит из следующих разделов: Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, Результатов и обсуждения, Выводов и Списка литературы. Диссертация изложена на 182 страницах, включает 69 рисунков, 21 таблицу и 223 литературные ссылки.

Вводная часть диссертации содержит все элементы общей характеристики работы. В ней рассмотрены актуальность темы работы, ее цели и задачи, научная новизна, практическая значимость, положения, выносимые на защиту, описана апробация работы и подготовленных публикаций.

Обзор литературы состоит из пяти частей. Для наглядности и простоты восприятия материала представленные данные проиллюстрированы большим количеством рисунков. В целом Обзор литературы хорошо построен и дает подробное представление о текущем состоянии проблемы.

В разделе Экспериментальная часть описаны материалы и методы, которые были использованы автором в его исследованиях. Этот раздел свидетельствует о том, что данная работа охватывает различные области современной науки и говорит о большом объеме проведенных исследований.

Раздел Результаты и обсуждение дает подробное объяснение по выбору используемых подходов и важности решаемых задач. Результаты всех экспериментов проиллюстрированы на соответствующих рисунках, графиках, диаграммах и систематизированы в соответствующих таблицах.

Первые два раздела данной главы посвящены получению и характеристике монолитных макропористых носителей, служащих как для иммобилизации ферментов, так и для хроматографического разделения продуктов ферментативных реакций. М.В. Волокитиной наряду с синтезом стандартных монолитных макропористых материалов на основе сополимеров глицидилметакрилата (ГМА) с этиленгликольдиметакрилатом (ЭДМА) были разработаны и оптимизированы методы синтеза новых макропористых монолитных гидрофильных материалов на основе сополимеров глицидилметакрилата (ГМА), 2-гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА) и этиленгликольметакрилата (ЭДМА), а также глицидилметакрилата (ГМА) и глицериндиметакрилата (ГДМА) в формате колонок с контролируемой поровой структурой. Кроме того был оптимизирован синтез макропористой монолитной колонки на основе сополимера лаурилметакрилата (ЛМА) и этиленгликольдиметакрилата (ЭДМА), необходимой для мониторинга поли(молочной кислоты) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Третья часть описывает иммобилизацию ферментов (рибонуклеазы А, β -ксилазы, β -ксилозидазы и эстеразы) на поверхность получаемых макропористых монолитных сорбентов. В данной главе М.В. Волокитина использовала как традиционный метод, основанный на реакции белков с эпоксидными группами, содержащимися на поверхности носителя, так и метод, основанный на введении промежуточного спейсера. В качестве спейсера было предложено использовать полимер 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы, предварительно окисленный периодатом натрия для получения реакционноспособных альдегидных групп.

Следующим этапом исследований было изучение влияния различных факторов, таких как природа поверхности материала-носителя, метод иммобилизации фермента, геометрия стационарной фазы, количество иммобилизованного фермента и скорость сквозного потока раствора субстрата через биореактор на эффективность гетерогенного биокатализа. Была исследована возможность применения гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых монолитных матриц для процессов деградации природных и синтетических полимеров. Полученные результаты сравнивали с данными по деградации полимерных молекул с использованием нативных ферментов. При этом были разработаны и оптимизированы конкретные хроматографические протоколы для анализа используемых высокомолекулярных субстратов (рибонуклеиновая кислота, поли(цитидиловая кислота), поли(молочная кислота), ксилан) и продуктов их деградации при использовании в качестве стационарных фаз макропористых монолитных сорбентов с необходимыми функциональными группами.

Найденные оптимальные условия ферментативного гидролиза и разработанные протоколы хроматографического анализа позволили создать хроматографические биокаталитические реакторы, в которых стадии биокатализа и мониторинга продуктов объединялись в один *on-line* процесс. Кроме того, была проведена успешная оценка возможности использования хроматографических биокаталитических реакторов в различных процессах биотехнологии, таких как очистка смеси биологически активных веществ от примесей РНК и получение ксилозы и ксилоолигосахаридов из древесного

ксилана. Таким образом, глава «Результаты и обсуждение» убедительно демонстрирует **новизну исследования и полученных результатов**. Стоит отметить, что работа написана грамотным научным языком и выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях с использованием современных методов исследования.

Ряд представленных результатов подтверждают большую **практическую значимость данной диссертационной работы как для науки, так и для производства**. Например, на основе данных по составам полимеризационных смесей и поровых характеристик полученных макропористых полимерных монолитных материалов, предложены рекомендации, позволяющие направленно контролировать характеристики получаемых матриц, необходимые для решения конкретных задач; разработанные хроматографические методы могут быть использованы для высокоскоростного анализа и сепарации различных природных и синтетических полимеров (РНК, поли(С), ксилан, ПМК) и продуктов их деградации; при исследовании влияния различных факторов на эффективность гетерогенного биокатализа выявлены наиболее перспективные методы создания и условия применения получаемых гетерогенных биокатализаторов; показана возможность эффективного использования разработанных хроматографических биокаталитических реакторов на основе макропористых монолитов в процессах биотехнологии.

Не вызывает сомнений **обоснованность и достоверность результатов** экспериментальной работы, научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Результаты исследования изложены последовательно и логично. Выводы, сформулированные на основе полученных результатов, обоснованы и полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования. В целом, работа представляет собой завершённое исследование, выполненное на высоком теоретическом и экспериментальном уровне.

При ознакомлении с работой возникли следующие **вопросы, замечания и пожелания**:

По структуре работы:

- в автореферате отсутствует пункт «Соответствие содержания диссертации заявленной специальности и отрасли науки»

- недостаточно раскрыта актуальность исследований, во «Введении» отсутствуют пункты: «Степень разработанности темы», «Теоретическая значимость работы», «Методология и методы исследования»;

- во второй главе отсутствует «Дизайн исследований», также отсутствует общая методологическая схема. Наличие этих пунктов способствует систематизации выполненных исследований;

- экспериментальные главы не везде заканчиваются выводами.

По содержанию работы:

- калибровочные кривые (например, рис. 3б) представлены не во 2-ой главе, а перенесены в главу 3 «Результаты и обсуждение»

- отсутствует обоснование выбора ферментов, используемых для иммобилизации

- не проведена статистическая обработка данных, и не представлена как на графиках, так и в таблицах

- термин «оптимизация процесса» применен не совсем корректно, так как отсутствует описание применяемого метода (статистический или феноменологический). Лучше использовать выражение «подобраны оптимальные условия»

- не дано обоснование необходимости использования второго высокомолекулярного субстрата (поли(С)) для определения активности рибонуклеазы

- список литературы содержит только 20 % источников за последние 10 лет

Технические недостатки:

- в списке сокращений отсутствует название некоторых веществ (например, полицитидиловой кислоты (поли(С))).

Вышеизложенные соображения имеют частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают общую положительную оценку работы, которая выполнена на высоком профессиональном уровне.

Основные результаты работы отражены в 4-х статьях, опубликованных в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ (3 международных) и 17 тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях и симпозиумах. Также диссертантом получен 1 патент РФ. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

В диссертационной работе М.В. Волокитиной убедительно показан потенциал применения разрабатываемых хроматографических биокаталитических реакторов. Представляется крайне перспективным дальнейшее развитие этих разработок. **Рекомендации по использованию результатов и выводов** диссертации включает расширение ряда используемых для изготовления биореакторов ферментов, а также выбор и обоснование наиболее эффективных условий эксплуатации систем.

Полученные автором результаты могут быть использованы в лабораториях, работающих в области энзимологии, биокатализа и биотехнологии, таких учреждений как Химический и Биологический факультеты МГУ имени М.В. Ломоносова, Институте биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» Федеральное государственное бюджетное учреждение Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова (лаборатория энзимологии), Научно-образовательный центр Нанобиотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования Сибирского федерального университета, Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Заключение

Диссертационная работа Волокитиной М.В. полностью удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым в пунктах 9-14 «Постановления о порядке присуждения ученых степеней» (№ 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор, безусловно, заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 02.00.06 – высокомолекулярные соединения.

Отзыв был заслушан и одобрен на заседании кафедры биотехнологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего

профессионального образования «Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации 20 января 2016 года (протокол № 5).

Доцент кафедры биотехнологии
ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России,
кандидат химических наук

(02.00.06 – химия высокомолекулярных соединений (химические науки))

доцент

Глазова Наталья Владимировна

Заведующая кафедрой биотехнологии
ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России,
кандидат биологических наук

(03.00.23 – биотехнология (биологические науки))

доцент



Колодязная Вера Анатольевна

26 января 2016 года

197376, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России)

тел.: (812) 234-57-29; факс: (812) 234-60-44

электронная почта: info@pharminnotech.com

сайт: www.spcpa.ru

Подпись руки
удостоверяю 26.01.2016
Начальник ОД

Подпись руки
удостоверяю 26.01.2016
Начальник ОД

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертации 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.

Полное наименование	Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Сокращенное наименование	ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России
Место нахождения	Российская Федерация, Санкт-Петербург
Почтовый адрес	197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А
Руководитель	Ректор: д.фарм.н., профессор Наркевич Игорь Анатольевич
Контактный телефон	тел.: +7 (812) 234 57 29, факс: +7 (812) 499 39 03
Адрес официального сайта в сети Интернет	www.spcra.ru
Адрес электронной почты	info@pharminnotech.com

Перечень основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет

1. Нанопроизводные тетраеновых макролидных антибиотиков: получение и медико-биологические свойства / В.А. Колодязная, В.В. Белахов, А.В. Гарабаджиу // Успехи медицинской микологии. – 2015. – т. XIV. – С. 334-337.
2. Наноструктуры, включающие пероксидазу редьки черной, антибиотики и циклодекстрины для создания различных фармацевтических композиций / А.Н. Серкова, Н.В. Глазова, Н.В. Заинкова, Т.И. Муравьева, Н.Д. Бунятян // Фундаментальные исследования. - 2015. – № 2, ч.3. – С. 518-522.
3. Иммобилизация протеиназ с целью создания мягких лекарственных и косметических форм / Н.Д. Бунятян, Н.В. Заинкова, Т.И. Муравьева, А.П. Омелянова, Н.В. Глазова // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2, ч.3. – С. 514-517.
4. Исследование сорбции фенола и ароматических карбоновых кислот на молекулярных и модифицированных носителях / Н.В. Воронина, Н.В. Котова, Н.В. Глазова // Сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». - 2014. – С. 312-315.
5. Модификация носителей на основе агарозы для иммобилизации биомакромолекул и их применение в процессе хроматографического разделения / Т.И. Салихова, М.Н. Агафонова, Н.В. Глазова // Сборник материалов IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». - 2014. – С. 207-209.
6. Influence of Surface-Imprinted Nanoparticles on Trypsin Activity / António Guerreiro, Alessandro Poma, Kal Karim, Ewa Moczko, Jessica Takarada, Isabel Perez de Vargas-Sansalvador, Nicholas Turner, Elena Piletska, Cristiana Schmidt de Magalhães, Natalia Glazova, Anastasia Serkova, Aleksandra Omelianova and Sergey Piletsky // Advanced healthcare

materials, Germany. - 2014. – С. 11-15. - DOI: 10.1002/adhm.201300634

7. Создание и изучение наноструктур, включающих пероксидазу редьки чёрной / Н.В. Глазова, А.Н. Серкова // Материалы международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 20-22 марта, 2012г.). – 2012. – С.257-258.

8. Использование наносистем в качестве перспективы создания новых лекарственных форм / Н.В. Глазова, А.Н. Серкова // Сб. VII междун. науч.-практ.конф. «Наука и технологии: шаг в будущее» Praha, Publishing House “Education and Science”. - 2011. - V.3. - P.29-35

9. Использование наноматериалов для иммобилизации гидролитических ферментов / Н.В. Глазова, С.А. Новикова, А.В. Макагонов // Медицинская иммунология. - 2009. – т.11, №4-5. – С. 484-485.

Доцент кафедры биотехнологии
ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России,
кандидат химических наук, доцент

Глазова Н.В.

Заведующая кафедрой биотехнологии
ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России,
кандидат биологических наук, доцент



Колодязная В.А.

Ректор ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России,
доктор фармацевтических наук, профессор

Наркевич И.А.

«26» января 2016 г.

Подпись руки Глазова Н.В.
удостоверяю 26.01.2016
Начальник ОД Гавриш И.С.

Подпись руки Колодязная В.А.
удостоверяю 26.01.2016
Начальник ОД Гавриш И.С.

Подпись руки Наркевич И.А.
удостоверяю 26.01.2016
Начальник ОД Гавриш И.С.