



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИРКУТСКИЙ ИНСТИТУТ ХИМИИ им. А.Е. ФАВОРСКОГО
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИрИХ СО РАН)

ул. Фаворского, д. 1, г. Иркутск, 664033
Факс (395-2) 41-93-46. Телефон (395-2) 51-14-31, 42-59-00.
E-mail: irk_inst_chem@irioch.irk.ru
http://www.irkinstchem.ru
ОКПО 03533719 ОГРН 1023801755779
ИНН/КПП 3812011770/381201001

№ 15327/ 05-2115
От 13.04.2014

УТВЕРЖДАЮ

И. о. директора Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Иркутский
институт химии

им. А.Е. Фаворского Сибирского
отделения Российской академии
наук (ИрИХ СО РАН)



Д.Х.Н.

И.Б. Розенцвейг

2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук (ИрИХ СО РАН) на диссертационную работу Шахматова Евгения Геннадьевича **«Строение пектина и углеводной части арабиногалактановых белков борщевика Сосновского (HERACLEUM SOSNOWSKYI M.)»**, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия

На протяжении ряда лет в лаборатории химии растительных полимеров ФГБУН Институт химии Коми НЦ УрО РАН проводятся исследования процессов выделения высокомолекулярных соединений из различного растительного сырья, а также физико-химических свойств и структур растительных макромолекул. Диссертационная работа Евгения Геннадьевича Шахматова, выполненная в соответствии с планами НИР института и при поддержке проекта Уро РАН № 15-21-3-11, является весомым вкладом в разработку научных основ комплексной химической переработки возобновляемого растительного сырья.

Актуальность темы

Диссертация посвящена исследованию широко распространенных и чрезвычайно сложных по структуре растительных полимеров - пектиновых полисахаридов и арабиногалактановых белков (AGP), являющихся важными компонентами клеточной

стенки. Многочисленными исследованиями различных растительных объектов отдельные элементы структуры этих биополимеров изучены достаточно подробно. Накопленные данные позволили высказать предположение о существовании в клеточных стенках растительных тканей комплексов пектин – АРР. Однако вопрос о взаимодействии пектиновых полисахаридов и АРР между собой и с другими компонентами клеточной стенки до сих пор остается дискуссионным, что обусловлено, в первую очередь, сложностью и изменчивостью их структуры. Проведенные автором исследования по установлению химической структуры этих биополимеров и природы связей между ними вносят значительный вклад в решение проблемы выяснения строения растительной клеточной стенки.

Диссертационная работа Е.Г. Шахматова актуальна не только в теоретическом, но и в практическом плане. Полученные автором результаты послужат, с одной стороны, расширению сырьевой базы для производства отечественных биологически активных пектиновых полисахаридов, а с другой - помогут рационально решить проблему утилизации борщевика Сосновского, который занимает огромные территории и способен быстро накапливать значительную биомассу, содержащую ценные биологически активные соединения.

Научная новизна

Несмотря на широкое распространение и значительный потенциал практического использования, борщевик Сосновского не рассматривался как сырье для выделения пектиновых и других ценных биологически активных веществ. Автором впервые из надземной части борщевика Сосновского выделены и охарактеризованы пектиновые полисахариды, арабиногалактановые белки и связующие гликаны, изучено влияние природы экстрагента на выход и моносахаридный состав полученных продуктов, определены структурные элементы кора макромолекул пектина и углеводной части АРР.

Научно-практическая значимость

Полученные автором данные о химическом строении полисахаридов борщевика Сосновского расширяют знания о структурном разнообразии растительных полисахаридов и могут быть полезными при изучении особенностей строения биополимеров других травянистых растений, а также при исследовании зависимости их физиологической активности от структурных особенностей макромолекулы.

Диссертантом установлено, что надземная часть борщевика Сосновского содержит значительное количество пектина (до 17 %) и может служить сырьем для его промышленного получения. Это, несомненно, является важным практически значимым результатом работы.

Выполненное Е.Г. Шахматовым глубокое и всестороннее изучение структурных особенностей выделенных биополимеров является основой для разработки способов их переработки и определения областей применения.

Личный вклад автора

Е.Г. Шахматовым проработана отечественная и зарубежная литература по теме исследования, проведено планирование экспериментов, получена основная часть экспериментальных данных, проведены интерпретация и систематизация полученных результатов, написаны статьи и подготовлены доклады на конференциях.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Е.Г. Шахматова написана по традиционной схеме, изложена на 178 страницах, содержит 24 рисунка и 28 таблиц. Список цитируемой литературы включает 238 источников.

Во **введении** автор обосновывает актуальность проблемы, четко формулирует цели и задачи исследования. Диссертантом представлены положения, выносимые на защиту, полно отражены научная новизна, практическая и теоретическая значимость исследований.

Несомненно, поставленные цели и задачи вполне актуальны для кандидатской диссертации.

Глава 1 (обзор литературы) названия не имеет.

Раздел 1.1 - «Характерные особенности рода борщевик семейства Сельдереиные (Зонтичные) *Apiacea* Burnett (*Umbelliferae*)» содержит обстоятельный обзор литературы, посвященной семейству Зонтичные, в нем приводятся ботанические данные, сведения о распространенности, урожайности, свойствах и биологической активности, а также областях и возможностях применения растений рода *Heracleum* и, в частности, объекта исследований - борщевика Сосновского.

В разделе 1.2 подробно обсуждается структура полисахаридов различных растений семейства Зонтичные (*Apiaceae*).

В наиболее объемной части литературного обзора - **разделе 1.3** детально рассматриваются структурные особенности пектиновых полисахаридов, дается характеристика линейной и разветвленной областей их макромолекул.

В разделе 1.4 обзора представлены гипотетические структурные модели макромолекулы пектина, при этом подчеркивается сложность установления природы связей между ее фрагментами. Приводится схема строения пектиновой макромолекулы, включающая достоверно охарактеризованные структурные элементы.

В разделе 1.5 обсуждается литература, посвященная исследованию арабиногалактановых белков, их роли в процессах роста и развития различных растений, а также природы возможных взаимодействий с другими компонентами клеточной стенки, в частности, с пектиновыми веществами. Подробно рассматриваются моносахаридный состав и строение углеводной части AGP, составляющей 90 – 98 % их макромолекул. Рассматривается также биологическая активность AGP.

В разделе 1.6 представлены основные методы структурного анализа полисахаридов, которые использовались автором при выполнении диссертационной работы: химические биохимические, а также один из основных физико-химических методов – ЯМР спектроскопия. Кратко охарактеризованы методы 1D и 2D ЯМР спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C , применяемые для структурных исследований макромолекул полисахаридов.

В целом литературный обзор дает достаточно полное представление о свойствах полисахаридов растений семейства Зонтичные, достижениях и сложностях в их исследовании, современных методах установления структуры и перспективах использования этих практически значимых биополимеров. Отмеченная в обзоре ограниченность сведений о структуре полисахаридов борщевика Сосновского в сочетании с необходимостью решения проблемы его рациональной утилизации обосновывает актуальность, новизну и практическую значимость рецензируемой диссертационной работы.

В главе 2 подробно описаны экспериментальные условия, методики экстракции, выделения, модификации, а также методы исследования полученных веществ. Содержание этой главы свидетельствует о внушительном объеме проведенных диссертантом опытов и его высокой квалификации как экспериментатора.

Глава 3 – Результаты исследований и обсуждение, также не имеющая названия, включает 3 раздела и заключение.

В разделе 3.1 «Выделение и общая химическая характеристика полисахаридов *H. sosnowskyi*» автор обосновывает выбор схемы последовательной экстракции сырья, подробно обсуждает каждую стадию экстракции и приводит данные по выходу и моносахаридному составу полученных фракций. Полученные диссертантом результаты позволили установить, что в состав углеводных цепей полисахаридов борщевика Сосновского, экстрагируемых последовательно водой, раствором соляной кислоты и раствором оксалата аммония, входят характерные компоненты пектиновых полисахаридов и арабиногалактана типа II. Наличие во всех проанализированных фракциях белка справедливо связывается автором с существованием арабиногалактановых белков, что согласуется с литературными сведениями.

На основании данных по моносахаридному составу фракций, полученных экстракцией раствором КОН, автор делает вывод о принадлежности их к связующим гликанам - глюкоуроноарабиноксиланам и частично ксилотриозам. Полисахариды, выделенные экстракцией раствором NaOH, характеризуются автором как глюкоманнаны. К сожалению, наличие во всех выделенных щелочной экстракцией фракциях значительного количества белка – от 8,4 до 19,7 % (табл.4 и 5) диссертантом никак не обсуждается и не учитывается в предположениях о составе полисахаридов.

Раздел 3.2 - «Исследование структуры полисахаридов *H. sosnowskyi*» – содержит огромный экспериментальный материал, чрезвычайно подробно представленный в 29 подразделах. Комплексом методов: фракционированием полученных экстрактов ионообменной хроматографией, частичным кислотным и ферментативным гидролизом, деградацией по Смитсу автору удалось получить более простые по структуре полисахаридные фракции и фрагменты. Это позволило успешно применить для их детального исследования совокупность различных методик спектроскопии ЯМР (регистрация ^1H и ^{13}C ЯМР спектров, двумерные эксперименты COSY, HSQC, HMBC, ROESY). Следует отметить очень грамотную интерпретацию данных ЯМР спектров полисахаридов. На основании полученных результатов диссертант делает квалифицированные и вполне обоснованные заключения о строении структурных элементов макромолекул пектиновых полисахаридов и углеводной части арабиногалактановых белков, выделенных из надземной части борщевика Сосновского.

Выводы сформулированы четко и позволяют судить о научной значимости диссертационной работы. К сожалению, в выводах не отражены перспективные практические результаты (использование борщевика Сосновского как сырья для получения пектинов и ростостимулирующих веществ).

Представленные в диссертации результаты сомнения не вызывают, т.к. получены на сертифицированном оборудовании с использованием современных методов выделения и установления структуры природных соединений.

К сожалению, изложение диссертационной работы вызывает ряд замечаний и вопросов. В значительной мере это обусловлено большим объемом экспериментального материала.

1. Текст диссертации содержит множество повторений и излишнюю детализацию. Так, используя одни и те же методики, например, ионообменную хроматографию, ферментативный гидролиз или фенол-сернокислотный метод, диссертант многократно подробно описывает их в экспериментальной части, а затем дублирует в обсуждении результатов. Все это загромождает и без того объемный материал и затрудняет его восприятие.

2. В экспериментальной части фенол-сернокислотный метод обнаружения углеводов (метод Дюбуа) представлен как метод Смита (с. 39, 41, 44, 51, 52, ссылка [195]). Эта ошибка неоднократно повторяется далее и в обсуждении результатов.
3. В характеристике исходного продукта нет данных о влажности свежего и воздушно-сухого сырья, поэтому значение выхода (например, 9 % от исходного свежего сырья, с. 43) мало информативно. Количества выделенных экстракцией, а также полученных различными превращениями и фракционированием продуктов, приведенные в миллиграммах, автор ошибочно представляет как «выход».
4. Данные таблиц 1-5, 9, 12, 20 дублируются в тексте.
5. Непонятно, от какой величины рассчитывались выходы моносахаридов и белка (вес.%), приведенные в таблицах 1- 6, 9, 12, 15, 17, 20, 23, 25.
6. Названия подразделов 3.2.2 – 3.2.28 в обсуждении результатов дублируют названия подразделов экспериментальной части и не отражают сути представленных результатов. Например, 2.4.6 (с. 48) и 3.2.17 (с. 99) «Ферментативный гидролиз полисахарида *HS_O-I*» и т.д. В сочетании с неудачной компоновкой результатов это затрудняет восприятие изложенного материала.
7. В подразделе 3.2.5 приведена схема выделения полисахаридов *HS_W-S*, *HS_A-S*, *HS_O-S₁* и *HS_O-S₂* из супернатантов, полученных на разных стадиях экстракции, а название подраздела - *Выделение полисахарида HS_W-S*.
8. Таблица 9 расположена в подразделе 3.2.7, а обсуждается в следующем подразделе 3.2.8.
9. Из таблицы 10 следует, что полисахариды *HS_O-S₁* и *HS_O-S₂* содержат значительное количество белка (17,1 и 13,0 % соответственно), однако автором эти данные не обсуждаются.
10. В таблице 12 (с. 83) приведены характеристики фракций *HSoH₁* и *HSoH₂*, а схема их получения и описание приводится только в следующем разделе.
11. В подразделе 3.2.25 отмечается, что полученный при ферментативной обработке полисахарид *HSO-I-SD-F* характеризуется невысоким содержанием урсонических кислот. Но, по данным таблицы 25, величина их выхода достаточно высока (32,0 %).
12. Разделы 3.3 (О строении пектина *H. sosnowskyi*) и 3.3.1 (О строении углеводной части макромолекул арабиногалактановых белков *H. sosnowskyi*) логичнее было поменять местами с подразделом 3.2.29 (Определение биологической активности полисахаридов *H. sosnowskyi*).
13. Текст диссертации отличается многословием, изобилует громоздкими фразами, содержит множество сложноподчиненных предложений, затрудняющих понимание их

смысла. Например: «Подводя итог вышесказанному, можно сделать заключение, что данные ЯМР спектроскопии подтверждают, что кор полисахарида...» (с. 86); «Подводя итог вышесказанному, можно сделать заключение, что с помощью ЧКГ определено, что кор полисахарида...» (с.92), «Подводя итог вышесказанному, можно сделать заключение, что структурное исследование полисахарида $HS_{O-I-F_3-2_2}$ свидетельствует о присутствии...» (с.114) и др. В разделе 3.2.29 (с. 134) предложение: «Для проведения исследования биологической активности полимеров, выделенных из надземной части *H. sosnowskyi*, было изучено влияние фракций: HS_W-I , которая содержит главным образом свободные AGP; HS_W-III , которая состоит главным образом из AGP и пектиновых полисахаридов; HS_W-V и HS_A-I , представляющих собой смесь AGP и пектиновых полисахаридов, с преобладанием последних; HS_O-I и HS_O-III , характеризующихся значительным преобладанием пектиновых полисахаридов и минорным количеством AGP; HS_K-I и HS_N-I , содержащих главным образом связующие гликаны класса глюкуроноарабиноксиланов и глюкоманнанов соответственно (табл. 1-5)» не закончено по смыслу.

Следует также отметить однообразие и неудачную формулировку фраз в обсуждении результатов, например, разделы 3.2.10, 3.2.13, 3.2.18, 3.2.19, 3.2.21, 3.2.22 начинаются однообразными и неверными по смыслу предложениями: «Подробный анализ ЯМР спектров... позволил установить сигналы...».

14. Заключение отличается многословием, содержит излишние сведения из экспериментальной части и литературного обзора и, на наш взгляд, требует более четкого изложения.
15. При обсуждении ЯМР исследований белковой части макромолекул AGP в разделе 3.2.27 желательно сделать отнесения химических сдвигов сигналов, наблюдаемых в 1H и двумерных ЯМР спектрах фрагментов, к определенным структурным элементам и функциональным группам аминокислотной составляющей.

Отмеченные недостатки не снижают общей положительной оценки работы.

Автореферат в основном отражает содержание диссертации и дает полное представление об объеме, научной и практической значимости полученных результатов.

Достоверность основных выводов диссертации не вызывает сомнения, т.к. они базируются на большом объеме экспериментальных данных, хорошо согласующихся между собой.

Содержание диссертационной работы с достаточной полнотой представлено в публикациях. По теме диссертации опубликовано 4 статьи, из них 3 – в высокорейтинговом международном журнале «Carbohydrate Polymers» (импакт-фактор

4,219). Основные результаты работы были представлены на одной Международной и 6-ти Всероссийских конференциях.

Диссертация Е.Г. Шахматова «**Строение пектина и углеводной части арабиногалактановых белков борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* M.)**», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук, является научно-квалификационной работой, расширяющей представления о структурном многообразии растительных полисахаридов, а также открывающей возможности для выявления зависимости их биологической активности от структурных особенностей макромолекулы. Результаты работы могут использоваться для решения проблем биоорганической химии, связанных с выяснением функций пектиновых веществ и арабиногалактановых белков в строении растительной клеточной стенки. Полученный диссертантом обширный экспериментальный материал является перспективным для разработки рациональных промышленных способов выделения ценных полисахаридов из наземной части борщевика Сосновского. Результаты работы могут быть использованы для чтения лекций по химии углеводов в высших учебных заведениях, а также внедрены в производство с целью получения отечественного пектина и других биологически активных веществ. По актуальности выбранной темы, объему выполненных исследований, научной новизне и значимости результатов для практического использования диссертационная работа Е.Г. Шахматова отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор - Евгений Геннадьевич Шахматов заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании лаборатории химии древесины Федерального государственного бюджетного учреждения науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, протокол № 5 от 12 апреля 2017 г.

Заведующий лабораторией химии древесины
Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН
доктор химических наук, профессор



В.А. Бабкин

Подпись В.А. Бабкина заверяю
Ученый секретарь ИрИХ СО РАН к.х.н.



Т.Н. Комарова