

ВІДГУК

офиційного опонента на дисертаційну роботу Стасюк Наталії Євгенівни "Мікроробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів", представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, 091 - Біологія

Актуальність дисертаційної роботи. Вирішення актуальних проблем харчової промисловості, медицини, контролю за забрудненням та захисту довкілля гостро потребує розробки та впровадження принципово нових методів та технологій, що базуються на високоспецифічних ензимах, отриманих із природних або генетично модифікованих мікроорганізмів. Досягненням прикладної мікробіології є покращення як існуючих продуcentів біологічно активних сполук, так і конструювання нових рекомбінантних штамів, здатних до надсинтезу цільових продуктів. Поєднання досягнень у сфері мікробіології, біохімії, генетики, ензимології, біотехнології та мікроелектроніки привело до створення нового класу аналітичних систем — біологічних сенсорів, в яких у ролі біоселективного елемента використовують ензими або генетично-модифіковані організми. Головною перевагою біосенсорного підходу є їхня висока чутливість, селективність, експресність, можливість проведення масштабних досліджень навіть у польових умовах та порівняно невисока вартість аналізу загалом. Достатньо прості методи синтезу нанозимів (НЗ), їхні унікальні каталітичні властивості, здатність до специфічного зв'язування з багатьма біологічними молекулами робить їх привабливими об'єктами для досліджень у біосенсорних технологіях.

Зважаючи на актуальність вищезгаданих проблем, основну увагу в дисертаційній роботі приділено синтезу нових штучних ензимів – нанозимів; дослідженню структурних, фізико-хімічних та каталітичних властивостей НЗ у поєднанні їх з мікробними ензимами; вивченю біологічної та можливої токсичної дії нанозимних композитів на клітини дріжджів *Ogataea polymorpha*; кон'югації наноматеріалів з мікробними ензимами та створення на їхній основі нових біоаналітичних методів – біонаносенсорних та нанозимно-ензиматичних.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота є кваліфікаційно-науковою працею на правах наукової доповіді за сукупністю статей, викладена

на 516 друкованих сторінках. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновків, переліку використаних джерел і додатка.

В огляді літератури розглянуто основні аспекти синтезу нанозимів, переваги порівняно з природними ензимами та перспективи практичного застосування. Наведено детальний аналіз оцінки каталітичної ефективності нанозимів за їхніми каталітичними параметрами, основні досягнення в галузі створення мікробних та ензимних амперометричних біосенсорів на основі дріжджових клітин, ензимів та нанозимів, а також перспективи використання в клінічній діагностиці та контролі якості харчових продуктів з метою аналізу вмісту практично важливих сполук, сучасні біоаналітичні підходи щодо кількісного визначення вмісту креатиніну.

Розділ 2 Матеріали та методи. У роботі використано очищенні препаратори мікробних оксидоредуктаз та деаміназ, нанорозмірні матеріали з ензимоподібною активністю; комбінації природних ензимів із нанозимами та комплекс різноманітних методів, зокрема, мікробіологічні, генно-інженерні, біохімічні, фізико-хімічні, електрохімічні, аналітичні та біосенсорні методи дослідження. При аналізі активності ензимів та чистоти ензимних препаратів використано методи спектрофотометричного аналізу, електрофорезу білків за нативних та денатуруючих умов, іонообмінна та афінна хроматографія. Для фізико-хімічного та структурного аналізу нанономатеріалів використано методи сканувальної електронної мікроскопії, рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової мікроскопії, трансмісійної електронної мікроскопії, Раманспектроскопії та спектроскопії ядерного магнітного резонансу. Як референтні методи для аналізу іонів металів (Mn^{2+} та Co^{2+}) використано атомно-абсорбційну спектроскопію. При конструюванні амперометричних біосенсорів застосовано циклічну вольт-амперометрію та хроноамперометрію, статистичний і кореляційний аналіз.

У розділі 3 «Скринінг нових наноматеріалів на псевдоензиматичну активність та дослідження структурних і каталітичних властивостей отриманих нанозимів» представлено основні етапи синтезу нових нанозимів (НЗ), поєднуючи хімічне відновлення неорганічних солей перехідних або шля-

хетних металів аскорбіновою кислотою з новим методом осадження НЗ на металеві пластинки. У даному розділі описано також метод «зеленого» синтезу біонаночастинок за використання клітин термотolerантних дріжджів *Ogataea polymorpha* та досліджено процеси редукції неорганічних солей дріжджовою культурою і формування позаклітинних стабільних біонаночастинок. Здійснено структурну характеристику усіх отриманих наноматеріалів. Встановлено, що розмір отриманих матеріалів знаходиться в межах від 10 нм (НЗ) до 15 мкм (мікрозими, МЗ). Досліджено каталітичні властивості та субстратну специфічність усіх отриманих НЗ. Встановлено, що найвищою пероксидазною активністю серед синтезованих НЗ володіють CuCeAu та Cu. Визначено кінетичні параметри для отриманих "голих" НЗ і МЗ та їх модифікованих полімерами форм. У пероксидазних реакціях, більшість синтезованих НЗ виявляють найвищу активність стосовно *o*-діанізидину.

У розділі 4 «Вивчення біологічної та можливої токсичної дії нанозимічних композитів на еукаріотичні клітини дріжджів *Ogataea*» наведено дослідження біологічної дії наночастинок (НЧ) на еукаріотичні клітини дріжджів *Ogataea polymorpha*. Клітини вирощували на середовищі із додаванням різних НЧ, синтезованих на основі шляхетних і переходних металів, а також їх гібридів, що володіють ензимними та флуоресцентними властивостями. Доведено, що всі НЧ у мінімальній концентрації (до 0,1 мг/мл) нетоксичні для клітин дріжджів. Показано, що біметалеві НЧ володіють стабільною флуоресценцією в розчині та всередині клітин, що дозволяє спостерігати явище переходу НЧ від батьківських до дочірніх клітин через щонайменше три покоління з подальшим вивільненням із модифікованих клітин. Для оцінки впливу нанозимів на життєздатність клітин дріжджів, крім тесту на ростову активність, використовували барвники, які реагують на зміни цілісності та функціональності клітинної мембрани. Встановлено, що нанозими (у концентрації 0,1 мг/мл у середовищі) проявляють різний цитотоксичний вплив на клітини дріжджів *O. polymorpha*: «катазими» знижують виживання клітин до 4,5 рази, тоді як НЗ з пероксидазною активністю дещо підвищують цей показник. У цілому, ці дані корелюють із результатами вивчення впливу НЗ на ростову активність клітин. Ймовірно, спостережувана відмінність у дії НЗ на клітини дріжджів пов'язана із різною ефек-

тивністю транспорту НЗ у клітини та різний вплив поглинутих НЗ на метаболічні клітинні процеси.

У розділі 5 «Створення амперометричних біосенсорів на основі нанокомпозитів – хемоміметиків пероксидази і мікробних ензимів, придатних для аналізу етанолу, метиламіну та аргініну» представлено основні підходи щодо конструювання амперометричних біосенсорів на основі нанозимів із псевдо-пероксидазною активністю та мікробних оксидаз. У поєднанні з нанозимами, використовували алкогольоксидазу *O. polymorpha*, глюкозооксидазу *Penicillium vitale*, аргініноксидазу *Amanita phalloides* та метиламінооксидазу *O. polymorpha*. Для формування біоселективного шару досліджували методи ковалентної та електростатичної кон'югації ензимів на поверхні наноносіїв. Для вивчення впливу модифікації поверхні електрода на біоаналітичні характеристики біонаносенсорів, в ролі хемоміметиків ПО вибрано нанозими, синтезовані методом хімічного відновлення або електроосадження з розчину солей. З метою підвищення чутливості сенсорних систем, поверхню електродів додатково модифікували пористим золотом. Запропоновані біонаноелектроди використовували для аналізу глюкози, первинних спиртів та метиламіну. Розроблені моноензимні біонаносенсори показали покращені аналітичні характеристики, порівняно з відповідними бієнзимними амперометричними електродами, що містили природну пероксидазу.

У розділі 6 «Створення мікробних амперометричних біосенсорів на основі клітин, додатково збагачених цільовим ензимом *in vitro*» представлено результати досліджень *in vitro* щодо введення екзогенного ензиму (аргінази, алкогольоксидази та флавоцитохрому *b2*) в дріжджові клітини *O. polymorpha* з метою підвищення в них кількості цільового ензиму та подальшого застосування збагачених клітин у біосенсорному аналізі. Однією із основних особливостей НЧ є висока хімічна активність, що обумовлена їх підвищеною здатністю до йонного чи атомного обміну, адсорбції, до утворення поверхневих зв'язків із іншими адсорбатами. Доступні методи синтезу НЧ, а також їх спорідненість до багатьох біологічних молекул робить їх привабливими кандидатами для досліджень у сенсорних технологіях. Показано можливість посилення каталітичної активності рекомбінантних клітин шляхом додаткового введення в

них відповідних ензимів, кон'югованих з НЧ.

У розділі 7 «Створення амперометричних біо(хемо)сенсорів та тест-наборів на основі мікробних гідролаз: аргініндеімінази та аргінази і для кількісного аналізу L-аргініну» наведено результати досліджень щодо розробки амперометричних біо(хемо)сенсорів на основі амоній-селективних наночастинок та мікробних гідролаз – аргініндеімінази *Mycoplasma hominis* і аргінази I людини *O. polymorpha*. Для підвищення селективності аналітичних методів розроблено ензиматичні підходи, зокрема, електрохімічні біосенсори. Загалом усі сконструйовані біосенсори на основі ензимів для визначення L-аргініну ґрунтуються на визначенні концентрації продуктів, утворених у ензиматичних каскадних реакціях. Для конструкції амперометричних біосенсорів авторкою синтезовано металеві нанокомпозити – «нанохелатори», здатні утворювати редокс-активні координаційні сполуки з аміаком. На основі аргініндеімінази та гібридних наночастинок Cu/Zn(Hg)S сконструйовано амперометричний біосенсор для кількісного визначення вмісту L-аргініну. Створений біосенсор характеризується високою селективністю та чутливістю до L-аргініну. Створено два варіанти ензимо-флуоресцентного методу аналізу вмісту L-аргініну – моноензимний та двоензимний.

У розділі 8 «Створення амперометричних біо(хемо)сенсорів та тест-наборів за використання рекомбінантної креатиніндеімінази для кількісного аналізу креатиніну» представлено результати досліджень щодо розробки нових біоаналітичних методів (біонаносенсорів та ензиматичних тест-наборів) для кількісного визначення вмісту креатиніну – важливого біомаркера функціонального стану нирок. Як аналітичний інструмент використано рекомбінантну форму стабільної креатиніндеімінази (КДІ) мікробного походження. Опрацьовано оптимальну схему препаративного виділення та очищення (His)-тагованої рекомбінантної КДІ з клітин штама-продуцента *Escherichia coli* BL21 за використання оригінального методу рефолдингу ензима з тілець включення та метаплоафінної хроматографії на Ni-NTA-агарозі. Проведена фізико-хімічна та ензимологічна характеристики (His)-тагованої КДІ, зокрема, визначена молекулярна маса субодиниці, температурний та pH-профіль активностей. Розроблено високочутливий метод ензиматичного аналізу креатиніну за використання рекомбі-

нантної КДІ з спектрофотометричною та флуориметричною детекцією продукту реакції (йонів амонію) з пороговою чутливістю близько 6 мкМ та 0,2 мкМ, відповідно.

Основні результати дисертаційної роботи є новими. Стасюк Н.Є. сформувала фундаментальні засади отримання високоактивних та високоспецифічних біосенсорів для медичних та біотехнологічних цілей. Отримано експериментальні дані, які вперше в науковій практиці доводять можливість заміни природного ензиму (каталази) штучними «катализами», які повністю відновлюють здатність мутантних безкatalазних клітин метилотрофних дріжджів рости на метанолі.

Уперше в науковій практиці показано можливість заміни природного ензиму штучними «катализами», які повністю відновлюють здатність мутантних безкatalазних клітин метилотрофних дріжджів рости у середовищі, що містить метанол. Молекулярно-генетичний аналіз та секвенування локусу геному безкatalазного штаму дріжджів *Ogataea polymorpha* C-105 виявив дві мутації у гені каталази: заміна азотистої основи цитозину в 895 положенні кодуючої послідовності на іншу азотисту основу тимін та делеція С у положенні 896. Така комбінація веде до зсуву рамки зчитування і утворення стоп-кодону TGA, що спричинює у клітинах штаму C-105 продукцію нефункціонального, неповного протеїну.

Уперше показано цитотоксичну дію синтезованих нанозимів на клітини дріжджів *O. polymorpha*. На моделі високоочищеної Манган-залежної рекомбінантної людської аргінази I отримано препарати апоензиму, позбавленого металу, та здійснено реконструкцію холоензиму.

Вперше розроблено новий ензиматичний метод на основі апоензиму аргінази I та 2,3-бутандіонмонооксиму для селективного та ультрачутливого визначення вмісту іонів Mn²⁺ та Co²⁺ (на рівні 1 пМ та 2,5 пМ для іонів Mn²⁺ та Co²⁺, відповідно).

Вперше опрацьовано чутливі та селективні ензиматичні методи кількісного аналізу вмісту L-аргініну із флуоресцентним та спектрофотометричним способом детектування кольорового продукту реакції за допомогою *o*-фталевого альдегіду та високо очищених препаратів аргінази I і уреази або аргініндеіміна-

з.и.

Уперше використано поєднання каталітичних наноматеріалів і високоочищених препаратів ензимів класу гідролаз: аргінази I, креатиніндеімінази, аргініндеімінази при формуванні біоселективних елементів амперометричних біосенсорів на L-аргінін та креатинін.

Уперше за використання наноміметиків пероксидази і алкогольоксидази створено нові ензимо-нанозимні методи аналізу вмісту етанолу.

Практичне значення одержаних результатів. _Отримано нові нанозимні композити, придатні для біоаналітичного використання. Опрацьовано нові ензиматичні методи та відповідні біоаналітичні набори для визначення вмісту - аргініну та креатиніну, а також створено прототипи ензимних та мікробних біосенсорів на основі очищених препаратів ензимів класу гідролаз, клітин надпродуцентих штамів дріжджів та метал-гібридних наночастинок. Опрацьовано нові методи ензиматичного та біосенсорного моніторингу етанолу, L-аргініну, глюкози та метиламіну на основі L-селективних оксидоредуктаз та наноміметиків пероксидази. За результатами виконання дисертаційної роботи одержано три патенти України на корисну модель (№142490 від 10.06.2020 р.; №107543 від 10.06.2016 р.; №108773 від 25.07.2016 р.), що стосуються розробки ензиматичних методів для кількісного визначення L-аргініну, креатиніну та амонію в біологічних рідинах людини, у харчових продуктах та алкогольних напоях за використання високоочищених препаратів аргінази I, креатиніндеімінази та аргініндеімінази, відповідно.

Ступінь обґрунтованості і достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій підтверджуються комплексним підходом до вирішення поставлених задач, репрезентативною кількістю методів досліджень, статистичною обробкою отриманих результатів.

Ідентичність змісту автореферату і основних наукових положень дисертації. У тексті автореферату відображені основні положення, зміст, результати і висновки виконаної Стасюк Н.Є. дисертаційної роботи. Зміст автореферату та основні положення дисертації є ідентичними.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі

тез усних або стендових доповідей на численних міжнародних наукових конференціях, які наведено в дисертації.

Повнота викладу основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій в опублікованих роботах автора. За темою дисертації опубліковано 59 наукових праць, включаючи 24 статті у фахових виданнях (20 – у закордонних та 4 – у вітчизняних виданнях), з них 16 статей у виданнях, віднесені до першого і другого квартилів (*Q1* i *Q2*) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, 6 розділів монографій (4 – у закордонних, із них – 2 огляди належать до *Q1* SCImago та 2 – у вітчизняному виданні), 3 патенти України на корисну модель, 26 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях. Сумарний імпакт фактор публікацій за темою дисертації – 90,82.

Зауваження, побажання, дискусійні питання. Дослідження виконано на високому рівні з використанням сучасних методів, текст дисертації змістово викладено чітко і зрозуміло. Але, як це характерно для наукових досліджень дуже добра робота не позбавлена певних недоліків, а деякі положення потребують уточнень:

1. У вступі (стор. 119) у статті Creatinine Deminase: Characterization Using In Enzymatic Creatinine Assay And Production Of The Enzyme в таблиці 2 відсутні номери штамів мікроорганізмів.
2. Розділ 2. Методи дослідження описані дуже детально, хоча на відомі методи достатньо було дати посилання.
3. Розділ 2., стор. 131. Синтез НЗ та «мікрозимів» (Cd/Pd, Cu/Cd, Co/Cu, Cu/Au, Cu/Pt, Cu/Ag, Pt/Ag, Ag/Zn, Mn, Cu/Ce, Pd/Ce, Pd/Cu, Au, Pt/Au, Cu/Pd та ін.) проводили методом хімічного відновлення металів з розчину їхніх солей, за використання 1 mM розчину аскорбінової кислоти або Натрій боргідриду.

Запитання: Які кінцеві продукти металів утворюються?

4. Розділ 2. За рахунок яких зв'язків утворюються біметалеві комплекси?
5. Розділ 3. Наскільки стійкими з точки зору структури є нанозими при використанні?
6. Розділ 4. Відомо, що метали зв'язуються у клітинах з металотіонеїнами.

Запитання: Чи зв'язуються з цими білками нанозими і чи зберігається при

цьому їх псевдокаталітична активність?

7. Розділ 5. Поясніть, будь ласка механізм збільшення чутливості від 4 до 18 разів в результаті модифікації поверхні електроду нанозимом СиСе.

Перераховані зауваження не мають принципового характеру і не змінюють загальної позитивної оцінки дисертаційної роботи Стасюк Н.Є.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Стасюк Наталії Євгенівни "Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів", представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, 091 – Біологія є актуальною завершеною науковою працею, оформленою відповідно до вимог наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» та відповідає вимогам Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого постановою Кабінету міністрів України від 17 листопада 2021 року № 1197, а її авторка Стасюк Н. Є. заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук з наукової спеціальності 03.00.07 «Мікробіологія».

Проректор з наукової роботи Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, професор кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології, доктор біологічних наук, член-кор. НАНУ

Володимир ІВАНИЦЯ

