

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Смутка Олега Володимировича на тему: „L- і D-лактат-селективні оксидоредуктази, рекомбінантні клітини дріжджів *Ogataea polymorpha* та нанорозмірні матеріали для розробки нових ензиматичних і біосенсорних підходів кількісного аналізу молочної кислоти”, подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Актуальність теми дисертації. L- і D-стереоізомери лактату – важливі аналіти, що присутні у харчовій продукції та тілі людини, і які необхідно визначати для контролю якості продуктів чи функціонального стану організму людини (зокрема спортсменів). Наявні методи – недосконалі: вони можуть бути чутливими, але недостатньо селективними; інші методи селективні однак матеріало- чи трудомісткі і недешеві тощо. Саме це спонукає до опрацювання нових підходів до кількісного визначення стереоізомерів молочної кислоти. Отже, дисертаційне дослідження Смутка О.В. безперечно актуальне.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Робота дисертанта є частиною держбюджетних і грантових досліджень відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України за темами: “Створення нових біоаналітичних систем на основі оксидоредуктаз” (№ держреєстрації 0106U002598, 2006-2008 pp.), “Вивчення біорозпізнаючих властивостей мікро- і нанорозмірних об'єктів на основі ферментів та генетично модифікованих клітин з метою розробки нових біоаналітичних методів” (№ держреєстрації 0113U000142, 2009-2012 pp.), “Розробка нових біоаналітичних методів визначення вмісту L- і D-лактату та L-аргініну для діагностики деяких захворювань, контролю їх перебігу” (№ держреєстрації 0109U000118, 2013-2015 pp.); спільної програми наукових проєктів НАН України та УНТЦ “Генетична і білкова інженерія оксидоредуктаз з метою конструювання біонанорозмірних об'єктів аналітичного призначення. Генетичне конструювання надпродуцентів, очистка, стабілізація модифікованих ферментів та отримання біоселективних мембран на основі наноносіїв” (№ держреєстрації 0107U008204, 2007-2009 pp.); комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України “Дослідження в галузі сенсорних систем та технологій” та цільової програми наукових досліджень НАН України: “Розробка біо/хемосенсорних аналізаторів для визначення вмісту формальдегіду, L- та D-лактату, їх метрологічна оцінка та дослідна апробація” (№ держреєстрації 0113U002554, 2013-2016 pp.); українсько-литовського проєкту “Дослідження L- та D-лактат: цитохром c-оксидоредуктаз, виділених із рекомбінантних штамів дріжджів *Hansenula polymorpha*, і їх використання для конструювання амперометричних біосенсорів” (№ держреєстрації 0115U001971, 2014-2015 pp.); гранту INTAS FOOD CALL 00-0715 “Novel technology for fermentation process monitoring and quality control of alcoholic

beverages based on enzyme electrodes and kits”, гранты CRDF UKB2-9044-LV-10 “Production of trial series and preparation of technical documentation for bioanalytical kit for enzymatic analysis of L-lactate in clinical diagnostics and beverage industries”; індивідуальних проектів: INTAS for Young Scientists OPEN CALL 2005 Nr. 05-109-5207 “Construction of flavocytochrome *b₂*-overproducing strain by the use of *CYB2* gene-containing expression cassette, bioanalytical application of the recombinant enzyme as a bioselective element of an analytical kit and amperometric sensor”; FEMS-2006 (I) “Application of cells of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and enzyme from this source for development of new L-lactate selective bioanalytical approaches” та West-Ukrainian BioMedical Research Center (WUBMRC-2006) “Development of a novel L-lactate selective enzymatic kit based on flavocytochrome *b₂* from methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and its biomedical testing”. Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищезгаданих досліджень.

Новизна дослідження. Дисертаційна робота Смутка О.В. містить низку як методологічних інновацій, так і нових наукових результатів. По-перше, у фокусі його досліджень перебували два мітохондріальні ферменти дріжджів: L-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктаза (КФ 1.1.2.3; флавоцитохром *b₂*, ФЦ *b₂*) і D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктаза (КФ 1.1.2.4, DLDH). Досі ці ферменти на практиці не використовувались як елемент біоаналітичних знарядь. Новим для науки є факт прямого перенесення електронів з білка на неорганічний носій. Вперше опрацьовано підходи для надпродукції та очищення ФЦ *b₂* та DLDH. Для цього автор вжив як мікробіологічні так і генно-інженерні підходи. Запропоновано нові підходи на основі цих ферментів чи клітин, що їх продукують, для біоаналітичного визначення лактату. Запропоновані методи апробовано на реальних зразках, як-от слина чи піт.

Теоретичне значення результатів досліджень. Розвиток аналітичної біотехнології та нанотехнологій ведуть до дедалі глибшого взаємопроникнення біологічних, електрохімічних та матеріалознавчих концепцій. У цьому сенсі робота Смутка О.В. становить значний теоретичний інтерес як спроба поєднати різні підходи і виявити, чи вони дійсно дають можливість удосконалити вже наявні біоаналітичні підходи. Робота демонструє складнощі і перспективи міждисциплінарного підходу і створює підґрунтя для формування практичних рекомендацій у цьому керунку. Надзвичайно цікавими є дослідження безмедіаторного перенесення електронів з ФЦ *b₂* на золоті електроди. Судячи з аналізу наукової літератури, досі такий тип перенесення було продемонстровано лише на графітові носії. Отже, робота Смутка О.В. відкриває новий напрям молекулярних механізмів взаємодії між редокс-ензимами та неорганічними поверхнями.

Практичне значення результатів досліджень. Результати дисертаційного дослідження важливі для низки галузей, де потрібно визначати рівень лактату. Отримано стабільні штами *O. polymorpha* - продуценти термостабільного ФЦ *b₂* і DLDH та очищені препарати відповідних ферментів, придатні для біоаналітичного використання. Опрацьовано нові ензиматично-

фотометричні методи та відповідні біоаналітичні набори для визначення вмісту L- та D-лактату; біореактори для біотрансформації енантіомерів лактату, а також прототипи ензимних та мікробних біосенсорів на основі очищених препаратів ферментів, субклітинних фракцій, клітинних уламків та клітин надпродуцентних штамів дріжджів. Розроблено новий метод формування золотих наночастинок на поверхні робочого планарного електроду *in situ* та лабораторний протоп біосенсора «третього покоління» на L-лактат. Опрацьовано методи неінвазійного ензиматичного та біосенсорного моніторингу вмісту L-лактату в біологічних рідинах людини (поті та слині). Результати амперометричних досліджень використано для створення експериментального зразка автоматичного амперометричного аналізаторного приладу «Форматест-2010». За результатами виконання дисертаційної роботи одержано Патент США (No WO/2009/009656) та Патент на корисну модель України (№ 45283 від 10.11.2009 р.), що стосуються розробки ензиматично-фотометричного набору для кількісного визначення L-лактату з використанням очищеного препарату ФЦ b₂.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація є цілісним дослідженням, що охоплює всі ланки створення біосенсора – від конструювання й оптимізації штамів-надпродуцентів цільових ферментів, через очищення й тестування ферментів, далі конструювання різних сенсорів і тестування на реальних зразках. Мета і завдання дисертації чітко сформульовано. В огляді літератури докладно розглянуто метаболізм лактату, на основі найсучасніших джерел. Смуток О. В. застосував у своїй роботі сучасні методи мікробіології, генетики, аналітичної біохімії та електрохімії. Для досягнення завдань і мети роботи використано 5 основних штамів мікроорганізмів, 8 плазмід; методами біохімічного аналізу визначено рівні продукції низки ферментів за багатьох експериментальних умов. Положення, сформульовані в роботі, проілюстровані великою кількістю таблиць і рисунків. Список літератури включає 247 посилань. Результати опрацьовано статистично та обговорено з урахуванням сучасної наукової літератури. Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Зміст автореферату та основні положення самої дисертації – ідентичні. Висновки, зроблені здобувачем, логічно випливають з отриманих результатів. Тому достовірність положень та висновків й рекомендацій, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Матеріали дисертації сповна відображено у публікаціях та в авторефераті. За темою дисертації опубліковано 50 наукових праць, серед яких 20 експериментальних статей (з них 16 – у закордонних виданнях, що мають сумарний імпакт-фактор 46), 5 розділів монографій у співавторстві (з них 4 опубліковано закордонними видавництвами), 1 патент України і 1 патент США, а також 22 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях. Здобувач доповів матеріали дисертаційної роботи на багатьох міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах і симпозіумах.

Зауваження щодо дисертації:

1. Як на мене, надто довга актуальність Вступі, яка далі частково повторюється (стор. 61, 105, 157)
2. Стор. 108 – незрозуміло, чи відома кількість копій pGLG61, що інтегровано у геном
3. На низці рисунків немає планок похибок (напр. рис. 3.20), а для деяких не розшифровано її зміст (наприкінці методів зазначено, що це має бути вказано в легендах); 2 рисунки – 3.22, 3.23 – не згадуються в тексті
4. Таблиця 3.3 більше пасує до розділу Методи – опис властивостей детергентів не є результатом здобувача
5. Стор. 144 – незрозуміло звідки взявся *Archaeoglobus fulgidus*
6. Здобувач стверджує, що частина результатів про перетворення ізомерів лактату описано у його статті, послання №196. Однак, цю роботу присвячено формальдегіду.
7. Автор демонструє можливість конверсії ізомерів лактату, але бракує обговорення того, чи досягнуті рівні конверсії перспективні для дальшого опрацювання практичного методу.
8. Таблиця 4.2 у розділі Обговорення порівнює різні комерційно доступні лактат-селективні біосенсиори і створений у цій роботі біосенсор третього покоління. Хоча останній переважає відомі за деякими характеристиками, на загал він не виглядає як оптимальніший, зокрема порівняно з StatStrip Lactate. Наприклад, час аналізу не значно менший, стабільність нижча, а вища чутливість, судячи з результатів визначення лактату у поті, є швидше проблемою ніж перевагою. Здобувачеві слід докладніше обговорити цей момент.
9. Робота здобувача справляє враження методичної – як і належить, відповідно до її назви. Незважаючи на це, авторіві все ж варто більше звернути увагу на обговорення отриманих результатів. Розділ обговорення більше виглядає як розширені висновки. Здобувачем створено дуже багато прототипів сенсорів, але немає його власної узагальнюючої оцінки того, котрий сенсор/підхід, наприклад, найкращий для певного напрямку застосування. Слабко обговорено фундаментально цікаве явище безмедіаторного перенесення електронів на золотий електрод.
10. В роботі зустрічається низка опечаток і не дуже вдалих термінів (напр., «половина життя» - існує усталений термін «півжиття»).

Зазначені недоліки стосуються головно оформлення дисертації, не впливають на висновки роботи та не знижують її загальної високої позитивної оцінки.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані на підприємствах біотехнологічного профілю, що виробляють біосенсиори лактату чи методи усунення D-лактату; у навчальних закладах України різного профілю під час підготовки фахівців з мікробіології, біотехнології та генетики.

Висновок про відповідність дисертації вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника Виходячи з вищенаведеної оцінки дисертації, вважаю, що за актуальністю теми, науковою новизною, важливістю і значенням отриманих результатів для теорії й практики, високим методичним рівнем проведених фундаментальних досліджень, широким висвітленням їх у фахових виданнях та матеріалах наукових форумів, зв'язком з державними програмами та іншими позитивними якостями вона відповідає вимогам п. 11, 12 Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567,, а її автор, Смуток Олег Володимирович, заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю – 03.00.07 – мікробіологія.

15 травня 2019 р.

Доктор біологічних наук,
професор кафедри генетики та біотехнології
Львівського національного університету
імені Івана Франка



Б.О. Осташ

Підпис Б.О. Осташа засвідчую:
вчений секретар ЛНУ імені І. Франка, доц.



О.С. Грабовецька