

ВІДГУК

офіційного опонента доктора біологічних наук, професора Варбанець Людмили Дмитрівни на дисертаційну роботу **СМУТКА Олега Володимировича “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”**, представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, галузь знань 091 - біологія

Дисертаційна робота О.В. Смутка, присвячена генно-інженерному конструюванню продуцентів стабільних форм L- і D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктаз (ФЦ *b2* та DLDH, відповідно) на основі метилотрофних термотолерантних штамів *Ogataea (Hansenula) polymorpha* для отримання відповідних білків з підвищеною стабільністю, дослідженню особливостей регуляції синтезу цих ферментів рекомбінантними штамми, а також розробленню простих і ефективних методів їх виділення та очистки, є дуже актуальною. Це обумовлено тим, що L- і D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктази можуть бути використані при визначенні вмісту лактату, який входить в число найбільш важливих аналітів, оскільки є універсальним продуктом обміну речовин практично у всіх живих організмів, кінцевим продуктом тканинного обміну глюкози при нестачі кисню, основною міжклітинною енергетичною речовиною в тканинах мозку, а також натуральним компонентом вин та інших харчових продуктів, тому його зміст використовується для оцінки і контролю якості виробничої сировини і харчових продуктів. Контроль за вмістом лактату в крові також надзвичайно важливий для клінічної діагностики, оскільки рівень лактату в організмі людини змінюється при наявності ряду захворювань, наприклад, гіпоксії тканин, кардіогенного або бактеріально-токсичного шоку, дихальної недостатності, діабету. Аналіз цього метаболіту в крові спортсменів використовують для моніторингу фізичного навантаження з метою забезпечення оптимальних тренувальних режимів. Оскільки в метаболізмі людини виробляється тільки L-лактат, а бактерії можуть виробляти як D-, так і L-лактат, визначення концентрації D-лактату в асцитичній, плевральній, цереброспинальній і синовіальній рідині може служити високоспецифічним і чутливим методом для ранньої діагностики бактеріальної інфекції. Тому розробка методів, що характеризуються високою чутливістю, селективністю, широким діапазоном визначення концентрацій лактату і тривалою операційною стабільністю представляють великий інтерес. Однак, при наявності достатньої різноманітності методів визначення лактату: фізико-

хімічних, хімічних та ензиматичних, перевага віддається останнім. Методи, які засновані на каталітичній дії ферментів, прості в застосуванні, однак забезпечують найвищу специфічність, точність і відтворюваність. Серед них на сьогодні одну з лідируючих позицій займають біосенсорні методи визначення L- і D-лактату, так як специфічність іммобілізованого ферменту до свого субстрату дозволяє проводити вимірювання безпосередньо в зразку, без попередньої підготовки проб, що також скорочує час аналізу. В даний час широко використовуються біосенсори, засновані на дії ферментів лактатдегідрогенази (ЛДГ) м'язів ссавців або бактерійної лактат оксидази (ЛО). Однак в останні роки при створенні біосенсорів почали використовувати L-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктазу (флавоцитохром b2, ФЦ b2) дріжджів *Hansenula anomala* та D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктазу (DLDH) *Staphylococcus epidermidis*, а також обидва з цих ферментів із *Saccharomyces cerevisiae*, які завдяки своїм унікальним каталітичним властивостям (абсолютна специфічність до енантіомерів лактату, відсутність у потребі екзогенного кофактора), мають важливе біоаналітичне значення і здатні замінити NAD⁺-залежну ЛДГ або ЛО при визначенні вмісту лактату в біологічних рідинах та харчових продуктах. Але широке використання ФЦ b2 і DLDH із *Saccharomyces cerevisiae* у біоаналітиці гальмується вираженою лабільністю ферментів та труднощами їх виділення в активному стані. Тому Олег Володимирович поставив мету використати виділені ним ферменти ФЦ b2 та DLDH з *Ogataea polymorpha* для конструювання лактат-селективних біосенсорів із покращеними операційними параметрами в порівнянні з існуючими, використовуючи специфічні наноносії. За рахунок поєднання ФЦ b2 та DLDH ферментів *O. polymorpha* можуть бути суттєво покращені операційні характеристики біосенсорів (чутливість, стабільність, лінійність, точність) та на основі отриманих біонаномолекул будуть розроблені нові селективні біореактори, ензиматичні та біосенсорні підходи аналізу вмісту L- та D-лактату, придатні для використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці, спортивній медицині та харчових технологіях. Такі дослідження є актуальними як з фундаментальної точки зору, так і з практичної, оскільки відкривають можливості вирішення деяких задач медицини та харчової промисловості.

Про актуальність дисертаційної роботи Смутка О.В. свідчить також те, що дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетних тем: “Створення нових біоаналітичних систем на основі оксидоредуктаз” (№ держреєстрації 0106U002598, 2006-2008 рр.), “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 рр.), “Розробка нових біоаналітичних методів визначення вмісту L- і D-лактату та L-аргініну для діагностики деяких захворювань, контролю їх перебігу“ (№ держреєстрації 0109U000118, 2013-2015 рр.), 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 рр.), 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 рр.), українсько-литовського проєкту ”Дослідження L- та D-лактат:цитохром с-оксидоредуктаз, виділених із рекомбінантних штамів дріжджів *Hansenula polymorpha*, і їх використання для конструювання амперометричних біосенсорів” (№ держреєстрації 0115U001971, 2014-2015 рр.). Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищезгаданих досліджень.

Значимість роботи підтверджується її зацікавленістю і закордонними фахівцями, про що свідчить те, що вона виконувалась також і у рамках п’яти міжнародних наукових грантів. INTAS FOOD CALL 00-0715 “Novel technology for fermentation process monitoring and quality control of alcoholic beverages based on enzyme electrodes and kits”, гранту 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” та міжнародних індивідуальних проєктів: 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”.

Робота О.В. Смутка побудована традиційно: складається із «Вступу», основної частини, що включає «Огляд літератури» та експериментальну

частину, яка містить два розділи: «Матеріали і методи досліджень» і «Результати досліджень та їх обговорення», а також «Узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних літературних джерел», що містить 247 найменувань, один додаток, в якому наведений список наукових праць здобувача. Дисертація викладена логічно і доступно на 298 сторінках, із них основна частина займає 266 сторінок. Робота вдало проілюстрована наочними матеріалами, які включають 105 рисунків та 26 таблиць.

В огляді наукової літератури, який складається з 9 підрозділів, наведено аналіз даних сучасної літератури щодо характеристики L- та D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктаз (флавоцитохрому b2, ФЦ b2 і DLDH, відповідно) дріжджів. Представлена їх структурна, ензимологічна, фізико-хімічна характеристика та регуляція синтезу в клітинах дріжджів, а саме *Saccharomyces cerevisiae* та *Kluveromyces lactis*. Особливу увагу дисертант приділяє аналізу описаних ензиматичних методів визначення вмісту лактату і приходять до висновку, що більшість із них має ряд недоліків, основні із яких: низька селективність, громіздкість та дороговизна апаратури, необхідність у використанні додаткових реагентів або ферментів, недостатня стабільність і чутливість до інтерферуючого впливу супутніх речовин (більшість відомих біосенсорних методів). Крім того, ферменти, виділені із *S. cerevisiae* та *K. lactis* характеризуються високою лабільністю і складністю їх біоаналітичного використання. Саме цим зумовлена відсутність на сьогодні на світовому ринку комерційних препаратів обох ферментів. Водночас, використання нанорозмірних носіїв різної природи сприяє суттєвому покращенню основних операційних параметрів біосенсорів, підвищуючи їх чутливість, стабільність, лінійність та точність визначення. З огляду на це, О.В. Смуток приходять до висновку, що необхідна розробка нових високоселективних, чутливих та простих біоаналітичних методів визначення вмісту L- та D-лактату, зокрема, із використанням рекомбінантних клітин термотолерантних метилотрофних дріжджів *Ogataea polymorpha* - надпродуцентів стабільних форм ФЦ b2 і DLDH та розробка на їх основі новітніх мікро/нано-розмірних об'єктів в ролі носіїв ферментів.

Огляд літератури написано на високому професійному рівні з залученням сучасних посилань. Він свідчить про те, що О.В. Смуток добре орієнтується у наукових проблемах, які обговорюються в цьому розділі дисертації.

Експериментальна частина роботи, яка складається з двох розділів, присвячена вирішенню поставлених задач та обговоренню результатів проведеної роботи. Вражає широкий арсенал сучасних методів, наведених в

розділі «Матеріали та методи», який був використаний дисертантом для одержання результатів роботи. Це різноманітні мікробіологічні, генетичні, молекулярно-біологічні, біохімічні, фізико-хімічні, електрохімічні та біосенсорні методи, а також методи рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової та трансмісійної електронної мікроскопії, методи статистичного і кореляційного аналізу. Всі використані дисертантом методи описані в роботі досить повно. Саме ця розмаїтість використаних методик і обумовила успішне виконання роботи і одержання важливих наукових результатів, які представлені різними підрозділами (всього 6) одного розділу.

Наукова новизна та основні здобутки дисертаційної роботи, що мають фундаментальне значення, наступні:

– За допомогою генно-інженерних підходів дисертантом сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *O. polymorpha*: «tr1» (gcr1 catX CYB2) - надпродуцент ФЦ b2 та *O. polymorpha* «tr6» (gcr1 catX CYB2Δ/DLD1) – продуцент DLDH. Штам *O. polymorpha* «tr1» характеризується восьмикратним підвищенням питомої активності відповідного ферменту. Рекомбінантний штам *O. polymorpha* «tr6» не виявляє активності ФЦ b2, водночас, питома активність DLDH збільшується у шість разів, порівняно з вихідними штамами. Для позбавлення специфічної L-лактат:цитохром с оксидоредуктазної активності у продуцента DLDH проведено делецію гена CYB2 у батьківському штамі *O. polymorpha* C-105 (gcr1 catX), а вже на наступному етапі, гомологічний ген DLD1 надекспресовано в штамі sub2Δ під контролем сильного конститутивного промотора гена АОХ.

– Олегом Володимировичем успішно проведена робота щодо оптимізації умов синтезу цільових ферментів для обох рекомбінантних штамів дріжджів, зокрема, підібрано склад живильних середовищ, а також фази росту продуцентів, які забезпечують найвищу питому активність.

– Для одержання активних і стабільних ферментів дисертант провів скринінг низки детергентів для досягнення їх максимального виходу у безклітинні екстракти, а також розробив ефективні схеми їх очистки та стабілізації. Так, Олег Володимирович вперше використав новий метод очищення ФЦ b2 із безклітинних екстрактів штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr1» афінною хроматографією на амінопропілсилохромі, модифікованому цитохромом с в ролі ліганда, що дало можливість одержати очищений в 13 разів фермент з питомою активністю 10 Од·мг⁻¹ білка. Використання іонообмінної хроматографії на DEAE-TSK 650M гелі дозволило одержати очищений в 7 разів фермент DLDH із клітин штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr6» з питомою активністю 1.1 Од·мг⁻¹ білка.

- На основі очищеного ФЦ b2 та клітин *O. polymorpha* «tr6» створено лабораторні прототипи колонкових біореакторів для конверсії рацемату молочної кислоти до оптично чистого D-ізомера та усунення токсичного D-лактату.
- До здобутків дисертаційної роботи необхідно віднести те, що дисертантом уперше розроблено новий ензиматично-фотометричний метод визначення вмісту L-лактату у біологічних рідинах за використання рекомбінантного ФЦ b2 та «Берлінської блакиті». Цей метод захищено авторськими правами, зокрема, патентом на корисну модель України та Міжнародним патентом на винахід. Створений ензиматичний набір для визначення вмісту L-лактату переважає відомі комерційні аналоги за більшістю параметрів. Окрім того, автором запропоновано спосіб використання ФЦ b2 фермента, іммобілізованого на комерційних феромагнітних мікрочастинках (ФЦ b2-Fe-MЧ) для формування ензиматичних наборів для визначення L-лактату. Оскільки ензимні мікрочастинки можна усувати з реакційної суміші у магнітному полі, такі набори можна багатократно (принаймні, шестикратно) використовувати без втрати якості аналізу L-лактату.
- Розроблено новий фотометричний метод кількісного аналізу D-лактату, на основі пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6» чи субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями.
- На основі пермеабілізованих клітин штаму-надпродуцента ФЦ b2 *O. polymorpha* «tr1» дисертантом сконструйовано новий мікробний амперометричний біосенсор з покращеними біоаналітичними характеристиками. Він характеризується високою операційною стабільністю (понад 360 незалежних вимірювань) і стабільністю при зберіганні (більше двох місяців при 4 °C) у порівнянні з аналогічним ензимним біосенсором на основі очищеного ферменту (стабільність при зберіганні становила 7 днів при 4 °C), що можна пояснити збереженням нативної структури ФЦ b2 у природному оточенні – мембранах дріжджових мітохондрій.
- Уперше використано поєднання генетичної інженерії та нанотехнологій при формуванні клітинного біоселективного елементу амперометричного біосенсора на L-лактат. Показано, що збагачення клітин *O. polymorpha* ФЦ b2 за рахунок надекспресії відповідного гена та додаткового введення в клітини золотих наночастинок з іммобілізованим ферментом, суттєво покращує основні операційні характеристики біосенсора.
- Розроблено новий ензимний безмедіаторний амперометричний біосенсор «третього покоління» на L-лактат на основі очищеного рекомбінантного ФЦ b2 та наночастинок золота.

– Уперше використано препарати ФЦ b2 для неінвазійного біосенсорного моніторингу вмісту лактату в біологічних рідинах людини (поті, слині) та безпосередньо при контакті біоелектроду зі шкірою.

– На основі отриманих експериментальних даних Олег Володимирович розробив нові мікробні біосенсори на D-лактат з використанням клітинних уламків, субклітинної фракції, збагаченої мітохондріями, та клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr6». Завдяки делеції гена *CYB2*, кодуючого L-лактат-селективний флавоцитохром b2, мікробні біосенсори характеризувалися високою селективністю до D-енантіомера лактату.

– Розроблені біоаналітичні підходи на основі рекомбінантних клітин, клітинних уламків та очищених ферментів було використано для аналізу L- та D-лактату в реальних зразках рідин людини, харчових продуктів та фармацевтичних препаратів трансфузійного призначення.

Результати аналізу фактичних даних, які наведені в дисертаційній роботі, свідчать на користь того, що сформульовані О.В. Смутком основні наукові положення, висновки та рекомендації базуються на використанні широкого спектру сучасних засобів та методів проведення досліджень, послідовно викладені і повністю витікають із змісту дисертації. Статистичний аналіз результатів досліджень проведений на сучасному рівні за допомогою стандартних програм статистичного і кореляційного аналізу. Результати роботи представлені в достатній кількості (50) публікацій у наукових фахових виданнях та апробовані на багатьох наукових форумах різних рівнів. **Перераховане вище дозволяє оцінити основні наукові положення, висновки та одержані результати експериментальних досліджень О.В. Смутка як достовірні і науково обґрунтовані.**

Практична значимість одержаних дисертантом експериментальних результатів заключається у тому, що завдяки високій чутливості та селективності, а також надійності та простоті у використанні, опрацьовані ензиматичні та мікробні підходи кількісного аналізу L- та D-лактату можуть знайти практичне використання в клінічній діагностиці, фармацевтиці, спортивній медицині та харчових технологіях.

Характеризуючи в цілому розділ власних досліджень, можна стверджувати, що О.В. Смуток одержав результати, які мають певну наукову і практичну цінність. Результати власних досліджень представлено автором послідовно, з використанням загальноприйнятих для подібних робіт стилем. Узагальнення результатів дослідження свідчать про високий науковий потенціал дисертанта. Висновки повністю відображають результати проведених досліджень.

Дисертаційна робота О.В. Смутка, присвячена генно-інженерному конструюванню штамів – продуцентів стабільних форм L- і D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктаз (ФЦ b2 та DLDH, відповідно) на основі метилотрофних термотолерантних штамів *Ogataea (Hansenula) polymorpha* для отримання відповідних білків з підвищеною стабільністю, а також дослідженню особливостей регуляції синтезу цих ферментів рекомбінантними штамми, а також розробленню простих і ефективних методів їх виділення та очистки, **відповідає профілю «мікробіологія».**

Високо оцінюючи експериментальний рівень дисертаційної роботи, є необхідність задати дисертанту кілька дискусійних запитань стосовно фактичного матеріалу та інтерпретації одержаних даних.

1) Дуже важливою частиною роботи є дослідження, які стосуються виділенню та очистки ферментів. Дисертант очистку ФЦ b2 здійснював як афінною хроматографією на амінопропілсилохромі, модифікованому комерційним цитохромом с в ролі ліганда, так і іонообмінною хроматографією на DEAE-TSK гелі. Виникає питання, чому при очищенні **специфічною** афінною хроматографією препарат ферменту був менш гомогенним в SDS-PAGE електрофорезі (крім домінуючої полоси ФЦ b2 білка, були присутні і інші білкові фракції), ніж при очищенні іонообмінною хроматографією на DEAE-TSK гелі, хоча повинно було б бути навпаки?

2) Не зовсім зрозуміло, чому дисертантом не наведено профілей елюції обох досліджуваних ферментів на DEAE-TSK 650 M гелі, що дало б можливість побачити, наскільки йому вдалось їх очистити від супутніх білків, наявних в безклітинному екстракті?

3) Дисертант відмічає, що для обох ферментних препаратів проведено фізико-хімічну та ензимологічну характеристику. Але з фізико-хімічних характеристик О.В. Смуток для DLDH фермента дослідив тільки рН-оптимум, а для ФЦ b2 фермента – лише зміни його активності при різних температурних режимах зберігання. Для отримання D-лактату з рацемату шляхом специфічного окислення L-лактату дисертант використовує систему з флавоцитохромом b2, умови проведення експерименту: рН 7.0 та температура 37°C. Звідки взяли ці дані, якщо дисертант не вивчав рН та термо-оптимуми?

4) Не досить коректні підписи до деяких рисунків: відсутня видова назва мікроорганізму; коректніше писати не ріст клітин, а накопичення біомаси; питома активність ферментів виражається автором в різних місцях дисертаційної роботи по різному: в од.·мг⁻¹ білка, од.⁻¹мл, або просто в од, не вказуючи на що. У ферментології поняття питомої об'ємної активності не використовується. Питома активність – це активність на мг білка.

5) Не зовсім зрозуміло, чому електрофорез був проведений тільки в денатуруючій системі? В нативній системі молекулярна маса білка, можливо, була б і іншою?

б) Хотілось би почути обґрунтування дисертантом додавання в препарат очищеного фермента ФЦ b2 в процесі тестування потенційних стабілізуючих компонентів для зберігання фермента, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду – інгібітора протеаз, якщо дисертант вважає, що фермент є гомогенним?

Однак, ці запитання не мають кваліфікаційного характеру, не стосуються суті роботи і тому не впливають на високу позитивну оцінку виконаних досліджень. Їх сучасний рівень, однозначність отриманих результатів і використання широкого спектру найбільш сучасних методів аналізу, а також надзвичайно професійна апробація на сторінках 50 наукових праць, включаючи 20 статей у фахових виданнях, з яких 16 – у закордонних, з сумарним імпаکت фактором – 46 та чотирьох – у вітчизняних виданнях, п'яти розділах монографій (4 – у закордонних та 1 – у вітчизняному виданні), двох патентах (1 – патент США та 1 – патент України на корисну модель), а також 23 тезах доповідей на міжнародних наукових конференціях. свідчить, що **ступінь обґрунтування наукових положень, висновків та рекомендацій, наведених в дисертаційній роботі О.В. Смутка, є надзвичайно високим та надійним.**

Рукопис дисертації написано державною мовою з використанням фахової наукової термінології. Стель викладу матеріалів досліджень, наукових положень, висновків та рекомендацій забезпечує в цілому їх сприйняття. Структура Автореферату повністю відображає зміст дисертації.

ВИСНОВОК

Все вищезазначене вказує на те, що дисертаційна робота О.В. Смутка 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”, яка представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук, повністю відповідає спеціальності 03.00.07 – мікробіологія, є завершеною працею, в якій отримані нові науково-обґрунтовані результати, що у сукупності вирішують одну з конкретних наукових проблем мікробіології, спрямовану на поглиблене знання щодо генно-інженерного конструювання штамів *Ogataea polymorpha* – продуцентів L- і D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктаз з підвищеною активністю та стабільністю. Дисертаційна робота є змістовною і з суто практичної точки зору: адже її результати свідчать про перспективи їх

використання в клінічній діагностиці, фармацевтиці, спортивній медицині та харчових технологіях для визначення L- та D-лактату. Наведене вище дозволяє вважати, що дисертаційна робота Смутка Олега Володимировича за змістом, обсягом, новизною, актуальністю, методичним рівнем, якістю одержаних результатів та їх висвітленню у висновках і в друкованих роботах, по своєму науково-практичному значенню та оформленню повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567 на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, галузь знань 091 – біологія, а сам здобувач заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук.

Зав. відділу біохімії мікроорганізмів
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України
доктор біологічних наук, професор

Л.Д. Варбанець



Підпис
посвідчується
Зав. канцелярії
Л.В.МАКАРЕЦЬ