

Отзыв официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук **Кима Александра Леонидовича**

на тему «**Разработка биосенсоров на основе фермент-содержащих полиэлектролитных микрокапсул**» по специальности 1.5.6. Биотехнология

Создание инновационных биосенсорных систем – одна из актуальных задач современной биотехнологии. В частности, большой интерес вызывают системы на основе ферментов, они высокоперспективны для решения широкого спектра прикладных задач в пищевом производстве, медицинской диагностике и целого ряда других областей. При этом технологическим подходом для многократного использования сенсорного устройства и распространенным способом сохранения устойчивости ферментов является микрокапсулирование. Предложенные около 25 лет назад полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК), оболочки которых проницаемы для низкомолекулярных веществ и непроницаемы для высокомолекулярных, стали удобной основой разработки диагностических систем для определения концентрации функциональных веществ с помощью инкапсулированных ферментов.

Диссертационная работа А.Л. Кима представляет собой продолжение серии исследований лаборатории, направленной на создание биосенсоров на основе ПМК. Разработаны три новые диагностические системы: 1) на основе инкапсулированной уреазы, иммобилизованной на поверхности кварцевой пластины, для определения концентрации мочевины в растворах с использованием спектрофотометрического метода регистрации; 2) в виде инкапсулированной алкогольдегидрогеназы (АДГ) для определения концентрации этанола со спектрофотометрическим методом регистрации; 3) на основе инкапсулированной глюкозооксидазы (ГО), иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, для анализа глюкозы. Для всех трех систем установлен рабочий диапазон концентраций определяемых веществ и указано относительное стандартное отклонение получаемых результатов.

Оригинальность первой системы заключается в создании диагностической пластины с иммобилизованной на ее поверхности уреазой внутри ПМК со спектрофотометрическим методом регистрации сигнала (диссертант – один из

соавторов соответствующего патента на изобретение). Эта часть работы наиболее близка ранее полученным результатам лаборатории – для создания пластины использовали методику иммобилизации фермента путем послойной адсорбции полиэлектролитов и капсул с уреазой, подобную методику разработали ранее для иммобилизации уреазы в таких же ПМК на поверхности рН-электрода (Монтрель и др., 2006).

Если для первой системы были использованы ранее полученные данные по каталитическим свойствам уреазы в соответствующих ПМК, то для второй системы, прежде всего, требовалось изучение влияния полианиона и поликатиона оболочки на каталитические и конформационные свойства АДГ и подбор условий минимального ингибирования фермента полиэлектролитами. Впервые показано, что выбранный полианион незначительно, а поликатион существенно ингибируют активность АДГ. Установлено, что ингибирующее воздействие полиаллиламина на АДГ снимается использованием высокой ионной силы раствора (200 мМ NaCl) за счет электростатического экранирования поверхностных зарядов фермента ионами соли, а также добавлением сульфата аммония в низких концентрациях (5 мМ). Стоит подчеркнуть, что АДГ в инкапсулированной форме сохраняла активность на уровне 30%

по сравнению с нативным ферментом, а разработанная система продемонстрировала возможность многократного использования (до 15 раз) при извлечении капсул из анализируемой среды методом фильтрации.

Детально разработана третья оригинальная аналитическая система – биосенсор для определения концентрации глюкозы в виде инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью. При этом проделана большая кропотливая работа: продемонстрировано, что выбранные полиэлектролиты не влияют на активность фермента; реализованы инкапсуляция ГО методом копреципитации и нанесение ПМК с инкапсулированной ГО из водной суспензии на поверхность модифицированного берлинской лазурью рабочего электрода; исследована зависимость сигналов полученного биосенсора от концентрации буферного раствора, его ионной силы и кислотности, а также от концентрации глюкозы в растворе; проведены оценка долговременной стабильности

разработанной системы (до 5 месяцев) и ее тестирование на реальных образцах сока и алкогольных напитков. Кроме того, предложен способ повышения чувствительности разработанного глюкозного биосенсора за счет его модификации мультислойными углеродными нанотрубками.

Результаты работы, с одной стороны, имеют фундаментальное научное значение, так как расширяют знания о взаимодействии биомакромолекул с полиэлектролитами и связанных с ними механизмах ингибирования ферментов. С другой стороны, предложенные системы могут быть развиты до прикладного использования в качестве биосенсоров для определения концентрации таких важных веществ, как мочевины, этанол и глюкоза.

К достоинствам диссертации стоит отнести логичность в постановке научных задач и представлении результатов, большой объем проделанной экспериментальной работы, тщательность в проведении исследований. Достоверность результатов и сделанных заключений определяется использованием современных методов исследования, корреляцией с литературными данными, а также корреляцией данных, полученных различными методами анализа.

Основные результаты выполненного исследования опубликованы в виде 5 статей в научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, 1 главы в книге и 1 патента РФ, а также прошли апробацию на российских и международных научных конференциях. Опубликованные материалы и автореферат диссертации полностью отражают содержание диссертации.

По работе имеются следующие замечания:

- 1) Литературный обзор. При описании ПМК автор несколько раз упоминает о «полупроницаемости оболочки». Это важное свойство оболочки позволяет сохранять фермент внутри капсулы, защищать его от протеаз, при этом обеспечивая обмен низкомолекулярными компонентами с окружающей средой. Автору следовало бы подробнее описать это свойство оболочек ПМК, играющее важнейшую роль при создании разрабатываемых биосенсоров.
- 2) В п. 2.2. литературного обзора диссертант описывает диагностические системы, разработанные ранее на основе ПМК с ферментами. Однако ни здесь, ни в

обсуждении результатов не приведены никакие количественные характеристики этих систем для их сравнения с результатами, полученными в диссертации.

- 3) В литературном обзоре не процитированы работы коллектива кафедры энзимологии химического факультета МГУ, который практически 20 лет активно развивает тему инкапсулирования ферментов в полиэлектролитные оболочки.
- 4) Материалы и методы. Автор не описывает, какие углеродные мультислойные нанотрубки были использованы для модификации глюкозного биосенсора (характеристики, источник получения), нет и подробностей методики модификации ни в методической части (стр. 43), ни в части «Результаты и обсуждение» (стр. 82).
- 5) Непонятно, каким образом данные, полученные в результате исследования взаимодействия полиэлектролитов с АДГ и подбора условий снятия ингибирования фермента полиэлектролитами, были учтены в создании микродиагностикума на основе ПМК с АДГ.
- 6) На стр. 81-82 читаем: «Было показано, что активность фермента в капсулах зависит от молярности и концентрации хлорида натрия в буферном растворе, причем присутствие ионов калия оказывает вызывает большее снижение сигнала биосенсора, чем ионы натрия». Однако в диссертации приведены данные только по влиянию хлорида натрия.
- 7) Оформление. В диссертационной работе не хватает списка сокращений, это затрудняет чтение текста, так как далеко не всегда расшифровка сокращенного обозначения употребляется при его первом использовании.

В тексте встречается большое количество опечаток, например, на стр. 23 «Однако свободный фермент нельзя использовать повторно и обладает низкой стабильностью в растворе», стр. 26 «Инкапсулированный фермента иммобилизованный на твердой поверхности», стр. 63 «условия проведения ферментативной реакции минимизирующих их влияние». НАДН и НАД⁺ обозначены то русскими, то латинскими буквами.

Приведенные замечания не снижают общей положительной оценки диссертационной работы. По актуальности, научной новизне, методическому уровню и практической значимости результатов, объему проведенных исследований диссертационная работа полностью соответствует требованиям, установленным

Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ким Александр Леонидович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Букреева Татьяна Владимировна

доктор химических наук (специальность 02.00.11 – коллоидная химия), доцент
Зав. лабораторией биоорганических структур
Института кристаллографии им. А.В. Шубникова
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

Контактные данные:

119333, Москва, Ленинский проспект, 59

Тел. [REDACTED], E-mail: [REDACTED]

05.10.2023

Подпись Т.В. Букреевой удостоверяю.

Ученый секретарь ФНИЦ
«Кристаллография и фотоника» РАН
кандидат физико-математических наук

А.Е. Крюкова