

## **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**

Метод послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (метод layer-by-layer), активно развиваемый с конца XX века, отличается простотой техники и осуществляется в мягких условиях, что позволяет его использовать для иммобилизации биологически активных соединений. Несмотря на огромное количество научных публикаций по иммобилизации лабильных белков и ферментов с использованием техники послойной адсорбции полиэлектролитов активно продолжается изучение различных областей практического применения мультислойных полиэлектролитных микро- и наночастиц и капсул, сформированных на нерастворимых и растворимых матрицах. Перечисленные факты обуславливают актуальность представленного диссертантом исследования, целью которого являлась разработка диагностических систем с использованием фермент содержащих полиэлектролитных микрокапсул, востребованных для определения глюкозы, этанола и мочевины. В качестве объектов изучения автором выбраны востребованные и хорошо известные ферменты - уреазы, алкогольдегидрогеназы и глюкозооксидазы, а также одна из наиболее давно изученных, распространенных и стабильных пар синтетических полиэлектролитов (полистиролсульфат и полиаллиламин), комплекс которых легко образуется и устойчив в широком диапазоне pH, ионных сил и температур.

Научная новизна работы связана с изучением влияния полистиролсульфата и полиаллиламина на сохранение активности ферментов (алкогольдегидрогеназы и глюкозооксидазы) и в создании

подходов для получения диагностических систем, содержащих иммобилизованные ферменты, с использованием полиэлектролитных микрокапсул, полученных на основе микросфер карбоната кальция в форме ватерита. Автором были разработаны: 1) многоразовая диагностическая пластина для определения мочевины с помощью уреазы, предварительно осажденной в матрицу карбоната кальция и включенной в полиэлектролитные микрочастицы, которые были закреплены на поверхности между полиэлектролитными слоями; 2) многократно используемые мультислойные микрокапсулы с адсорбированной алкогольдегидрогеназой для анализа этанола; 3) биосенсоры на основе печатных электродов с берлинской лазурью, содержащие мультислойные микрокапсулы с глюкозооксидазой, а также дополнительно модифицированные мультислойными углеродными нанотрубками для повышения чувствительности при определении глюкозы.

Практическая значимость работы связана с тем, что предложенные диагностические системы и сенсоры достаточно просто получаются, могут храниться и многократно использоваться для определения концентраций мочевины, этанола или глюкозы в крови или продуктах питания (соки, вина).

Диссертационная работа Кима А.Л. построена по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, материала и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы. Диссертация изложена на 109 страницах, содержит 32 рисунка, 6 таблиц, 175 ссылок.

Во введении обоснована актуальность темы исследования и проанализирована степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, представлены положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из четырех подразделов. В разделе 1 обобщены методы анализа с использованием нативных и иммобилизованных

ферментов. В разделе 2 коротко описаны особенности получения микрокапсул путем послойной адсорбции полиэлектролитов, их использования для капсулирования ферментов, закрепления на твердых подложках и применения для создания диагностических систем, в том числе биосенсоров. Раздел 3 посвящен образованию комплексов полиэлектролитов с белками, а в разделе 4 рассмотрена термодинамика взаимодействий белков и полиэлектролитов.

В разделе «Материалы и методы» очень кратко описаны методики иммобилизации ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы методом соосаждения в сферы карбоната кальция и методом адсорбции в готовые частицы с растворенным ядром. Приведены методики анализа с использованием уреазы и алкогольдегидрогеназы. Представлено описание условий формирования сенсоров на основе глюкозооксидазы, как иммобилизованной в хитозановый гель, так капсулированной в мультислойные капсулы из полиалиламина и полистиролсульфоната, а также сенсоров, модифицированных углеродными мультислойными трубками.

Раздел «Результаты и обсуждение» включает четыре подраздела. Подраздел 1 посвящен разработке многоразовой диагностической системы для определения концентрации мочевины с использованием кварцевой пластины, которую покрывали мультислойми синтетических полиэлектролитов - полистролсульфоната и полиаллиламина, между которыми закрепляли микрочастицы, полученные послойной адсорбцией тех же полиэлектролитов на микросферы карбоната кальция в виде ватерита, содержащих соосажденную уреазу. На заключительном этапе получения диагностической пластины матрицу карбоната кальция растворяли с помощью этилендиаминтетрауксусной кислоты. В качестве характеристик системы приведены данные по многоразовому (до 62 раз) использованию пластины с уреазой для определения мочевины, характеристика зависимости оптической плотности при анализе с использованием пластины от концентрации мочевины с тремя линейными диапазонами (от 3 до 5, от 5 до

20, от 20 до 40 мМ) мкм, а также результаты сравнения применения пластины и данных стандартного метода определения мочевины с использованием уреазы в сыворотки крови пятерых волонтеров.

В подразделе 2 изучено влияние полистиролсульфаната и полиаллиламина на сохранение активности и конформационные свойства алкогольдегидрогеназы. Полиаллиламин при массовых соотношениях 1 : 1 и 1 : 5 существенно уменьшал активность фермента. С помощью флуоресценции показано, что присутствие полиаллиламина не влияло на третичную структуру белка. Увеличение содержания в растворах солей – хлорида натрия до 0,05 М и сульфата аммония от 0,005 до 0,15 М позволяло сохранять активность алкогольдегидрогеназы при образовании комплексов с ПАА. Полистиролсульфанат по данным флуоресценции влиял на четвертичную структуру алкогольдегидрогеназы, однако при массовых соотношениях 1 : 1 и 1 : 5 в течении 6 часов практически не оказывал влияния на активность фермента. Присутствие хлорида натрия в концентрации 0,2 М не оказывало существенного влияния, а в концентрации 2 М уменьшало активность лактатдегидрогеназы, что автор связывает с осаждением белка высаливанием. Сульфат аммония в концентрации 0,1 М также не оказывал существенного влияния на падение активности фермента в течение 20 часов. На основании полученных данных предложено проводить реакцию с ферментом, иммобилизованным в капсулы на основе полистиролсульфаната и полиаллиламина, в присутствии 0,1 М сульфата аммония.

В подразделе 3 представлены результаты изучения функционирования алкогольдегидрогеназы, иммобилизованной путем адсорбции в готовые капсулы из полистиролсульфаната и полиаллиламина, так как при предварительном соосаждении белка в микросферы карбоната кальция, последующем нанесении мультислоев и растворении карбонатной матрицы с помощью этилендиаминтетрауксусной кислоты фермент, содержащий цинк в активном центре, терял активность (данные не приводятся). Проведено сравнение характеристик нативной алкогольдегидрогеназы и

адсорбированной в мультислойные микрокапсулы в реакции с этанолом в различных концентрациях (вплоть до 100 мМ). Из зависимости скорости реакции расщепления субстрата от его концентрации определены константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции, которые соответственно были больше (в заключении диссертации почему-то для  $K_m$  написано ниже) и меньше для иммобилизованного фермента. Автор показал, что микрокапсулы с адсорбированной алкогольдегидрогеназой могут быть использованы для определения этанола в диапазоне концентраций 40 - 400 мМ в 15 последовательных циклах измерений.

В подразделе 4 были получены биосенсоры на основе глюкозооксидазы. На активность этого фермента полиалиламин, полистиролсульфонат и, по-видимому, этилендиаминтетрауксусная кислота не оказывали существенного влияния, поэтому при иммобилизации белок был соосажден предварительно в микросферы карбоната кальция. Для формирования биосенсоров на рабочий электрод после покрытия берлинской лазурью наносили мультислойные микрокапсулы или, для сравнения, хитозановый гель, содержащие глюкозооксидазу. Был проведен анализ характеристик двух биосенсоров в зависимости от рН буферного раствора, его молярности и концентрации хлорида натрия. Биосенсор с мультислойными капсулами имел линейный диапазон определения концентрации глюкозы в интервале 0,05 – 10 мМ при использовании в 15 последовательных измерениях, был более стабилен при хранении в течение 5 месяцев, чем контрольный биосенсор, сформированный с использованием хитозанового геля. На определение глюкозы с помощью биосенсора с мультислойными капсулами практически не оказывало влияние присутствие этанола (0,1 – 2,0 М), лимонной кислоты (0,06-0,9 М), что позволило использовать его для анализа этанола в образцах сока и алкогольных напитках с высокой корреляцией результатов (коэффициент 0,92) по сравнению с определением глюкозы стандартным методом.

В подразделе 5 для дополнительного повышения чувствительности биосенсора на основе мультислойных микрокапсул с глюкозооксидазой предложено проводить модификацию углеродными мультислойными нанотрубками (характеристика и источник нанотрубок не приведены), которые добавлялись в карбонатное ядро при получении частиц и в мультислойную оболочку. Использование мультислойных углеродных трубок позволило уменьшить сопротивление электродов и приводило к увеличению чувствительности биосенсора к глюкозе, что является важным.

В разделе «Заключение» кратко обобщены результаты работы. Выводы, сделанные в диссертации, четко сформулированы, следуют из изложенных результатов и соответствуют поставленным в работе задачам.

Список литературы содержит довольно много достаточно старых публикаций.

В целом диссертация Кима А.Л. выполнена на достаточно высоком научно-техническом уровне и обладает новизной, теоретической и практической значимостью.

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ: 5 статей в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI и имеющих квартиль от Q3 до Q1, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, 1 глава в книге и 1 патент РФ на диагностическую пластину для определения концентрации мочевины. Результаты диссертационной работы, выносимые на защиту, прошли достаточную апробацию на 6 научных конференциях, проходивших в России с 2017 по 2022 год.

Текст автореферата и печатные работы Кима А.Л. отражают содержание диссертации.

Представленная работа по обоснованности суждений, достоверности выводов, теоретической и практической значимости соответствует основным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Научная новизна и практическая ценность работы не вызывают сомнений. В целом работа может считаться завершенным научным исследованием. Полученные автором результаты имеют важное практическое значение для создания диагностических систем и биосенсоров.

Диссертационная работа Кима А.Л. не содержит существенных недостатков, однако имеется ряд замечаний.

1. В тексте диссертационной работы имеются опечатки и несогласования, отсутствует список многочисленных использованных сокращений, подписи некоторых таблиц и рисунков содержат недостаточно информации для понимания их содержания (в двух таблицах № 1 на страницах 50 и 51, рисунках 22, 23, 25, 26, 28, 32). При написании обзора использовано очень много английских терминов, которым есть альтернативная замена в русском языке. В списке литературы есть дублирование (ссылки № 23 и 151)

2. В обзоре литературы не использованы публикации последних лет по использованию послойной адсорбции полиэлектролитов для микрокапсулирования ферментов, но очень много внимания уделено публикациям группы Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН по использованию хорошо известной пары синтетических полиэлектролитов полистролсульфаната и полиаллиламина. Отсутствует обобщение данных литературы по капсулированию ферментов в виде наглядных таблиц. В конце обзора отсутствует заключение, которое позволило бы по достоинству оценить результаты, полученные в диссертационной работе по сравнению с тем, что уже было опубликовано в научных публикациях ранее.

3. Раздел «Материалы и методы» написан очень коротко. Недостаточно представлены методы, по которым можно оценить включение использованных ферментов в мультислойные капсулы, проанализировать правильность определения кинетических константы иммобилизованных ферментов. Хотелось бы видеть более подробное описание включения мультислойных микрочастиц с ферментом на кварцевую пластину, более

точные характеристики пластины при включении капсул и белка, а также более развернутые условия её хранения и промывок при последовательных измерениях концентрации мочевины.

4. В диссертационной работе автор использовал три фермента - уреазу, алкогольдегидрогеназу и глюкозооксидазу, однако в работе не приводятся и совершенно не обсуждают физико-химические (молекулярные массы, изоэлектрические точки), биологические свойства и строение этих белков. Хотя перечисленные свойства ферментов очень важны при изучении электростатических взаимодействий с использованными полианином полистролсульфанатом или поликатионом полиаллиламином, а также с мультислойными капсулами. В работе не приведены конкретные результаты по влиянию на активность выбранных ферментов этилендиаминтетрауксусной кислоты, что обуславливает выбор пути включения белков в мультислойные микрокапсулы. Кажется более удачным при изложении раздела «Результаты и обсуждение» в начале изучить взаимодействие всех выбранных ферментов с полиэлектролитами и этилендиаминтетрауксусной для выбора стратегии их включения капсулы, а затем излагать пути иммобилизации ферментов для создания диагностических систем и сенсоров.

5. На стр. 47 написано «Из описанного выше видно, что данный метод позволяет закрепить полиэлектролитные микрокапсулы на поверхности твердого носителя, что открывает возможность для создания диагностической пластины на основе инкапсулированного фермента, который сохраняет свою активность, а благодаря полупроницаемости оболочки субстрат из раствора может беспрепятственно проникать к ферменту (Рис. 5)». Однако из ранее описанных в разделе данных и рисунка 5 этого не следует, в том числе того, что касается сохранения активности капсулированного фермента.

5. Не совсем понятно почему при изучении влияния присутствия солей на активность алкогольдегидрогеназы взяты очень высокие концентрации

хлорида натрия, которые существенно ослабляют электростатические взаимодействия, разрушают полиэлектролитные комплексы, и приводят к осаждению фермента высаливанием. Автор долго изучал влияние полиэлектролитов на активность алкогольдегидрогеназы, а затем включил фермент в готовые мультислойные микрокапсулы. Не понятно, для чего была использована 0,1 М концентрация сульфата аммония, подобранная при изучении сохранения активности фермента в комплексе. Если эта концентрация применялась при анализе с использованием мультислойных частиц, то почему это далее нигде не указывается (рисунки 16 и 17).

6. На рисунке 16, где приводится зависимость скорости ферментативной реакции расщепления этанола с помощью нативной и адсорбированной в мультислойные микрокапсулы алкогольдегидрогеназы, не указано содержание белка в мультислойных частицах и не понятно было ли выравнено в анализируемых препаратах содержание белка. Кроме этого, сделан разрыв на оси концентраций этанола, в области соответствующей константе Михаэлиса, однако автору без использования графических преобразований удалось определить  $V_{\max}$  и  $K_m$  нативной и капсулированной алкогольдегидрогеназы.

7. На рисунке 18 приведены данные, иллюстрирующие пятнадцатикратное использование суспензии микрокапсул с алкогольдегидрогеназой для определения этанола, но не понятно, какое количество частиц было взято для анализа, сколько в них было включено фермента и каким образом частицы были многократно отделены от реакционной среды фильтрацией и далее промыты без разрушения их целостности. На сколько прочно удерживалась в микрокапсулах сорбированная алкогольдегидрогеназа при многочисленных инкубациях и фильтрациях? В работе отсутствуют данные микроскопии, позволяющие оценить целостность микрокапсул.

8. На рисунке 19 не понятна надпись на оси Y. Как была измерена активность глюкозооксидазы при различных соотношениях фермент и полиэлектролит, различных концентрациях глюкозы?

Следует заметить, что указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования Кима А.Л.

Диссертация Кима Александра Леонидовича отвечает 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:

Доктор химических наук, доцент,  
старший научный сотрудник кафедры химической энзимологии  
химического факультета ФГБУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»

Балабушевич Надежда Георгиевна

05.10.2023

Контактные данные:

тел.: [REDACTED], e-mail: [REDACTED]

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

1.5.6. Биотехнология

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3  
ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.  
Ломоносова», химический факультет