

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**СОЛДАТКІНА Олександра Олексійовича**

**«Основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів»,**

подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

за спеціальністю **03.00.20 – біотехнологія.**

*Актуальність дисертаційної роботи.* Дисертаційна робота Солдаткіна Олександра Олексійовича присвячена актуальному питанню сьогодення – розробці нових інструментальних методів аналізу, зокрема, нових біоаналітичних систем широкого спектру застосування.

Одним з найрозповсюдженіших класів біосенсорів, що інтенсивно досліджуються останніми роками, є електрохімічні біосенсиори. Популярність таких біосенсорів пояснюється їх невисокою вартістю, відносно швидкою та простою процедурою аналізу, невеликими розмірами вимірювальних приладів. Як чутливі елементи електрохімічних біосенсорів часто використовують ферменти завдяки високій швидкості реакцій, селективності та стабільності в іммобілізованому стані. Крім того, великий вибір комерційних препаратів очищених ферментів дає змогу конструювати біосенсиори на основі спряжених біохімічних реакцій.

Проте суттєвим недоліком ферментів, що можуть бути використані для створення електрохімічних біосенсорів, є відсутність здатності до використання чи утворення електроактивних речовин, які можна детектувати з використанням електрохімічних перетворювачів. Для вирішення цієї проблеми дисертант пропонує створення біосенсорів на основі кількох ферментів. Причому доцільність використання мультиферментних систем в біосенсорах не обмежується лише розширенням спектру речовин, які можна визначати. Такі мультиферментні системи дають змогу ще й покращити характеристики біосенсорів.



Отже, завдання, поставлені в дисертаційній роботі Солдаткіна О.О., яка присвячена розробці основ створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів на основі різних варіантів поєднання ферментативних реакцій в біоселективному елементі, є **актуальними**, а їх вирішення – своєчасним. Актуальність роботи підтверджена її зв'язком з науково-дослідними роботами відділу біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського Національного університету імені Тараса Шевченка: НДР № 16БФ07-03 «Комп'ютерне моделювання та експериментальні дослідження біологічних наноконструктивних комплексів», НДР № 2.2.4.22 «Електрохімічні мультибіосенсиори та сенсорні масиви: фундаментальні основи створення та функціонування», NATO Science for peace and security programme № SWP.NUKR.CLG984221 «Development of biosensors for botulinum neurotoxin determination with applicability to screening foods against biological terrorist attacks», УНТЦ № 6177 «Використання функціональних наноматеріалів для створення біосенсорних кондуктометричних приладів для визначення аргініну», УНТЦ № 6052 «Ферментна мультибіосенсорна система для діагностики ниркової дисфункції та контролю процедури гемодіалізу», УНТЦ № 4591 «Development of enzyme multisensor arrays for ecological monitoring of toxins», білатерального проекту Україна-Індія № М/384-2012 «Developing Electrochemical and Photochemical Biosensors using Chloroplast and Enzymatic Membranes», FP7-PEOPLE-IRSES-2008 проекту «Nanosensors based on nanomaterials» № 230802, FP7-PEOPLE-IRSES-2012 проекту «Integrated nanomaterials and nanodevices» № 318524, державним замовленням «Розроблення ферментного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів для визначення сечовини та креатиніну у медичній діагностиці» № ДЗ/45-2015, державним замовленням «Розроблення портативної біосенсорної системи для експрес-діагностики інфаркту міокарда та інших



захворювань» № ДЗ/25-2017, в рамках Програми «EUREKA» «Multiple biosensor device for monitoring of hemodialysis patients (HemoSensor)», № E!8835.

**Основні наукові результати та новизна досліджень.** Дисертаційна робота Солдаткіна О.О. є суттєвим внеском в розвиток уявлень щодо створення біосенсорних систем як складових аналітичної біотехнології. У дисертаційній роботі вперше запропоновано розгорнуту методологію створення різних варіантів мультиферментних біоселективних елементів біосенсорів для застосування в медицині, харчовій промисловості, сільському господарстві, науковій практиці, а також для контролю біотехнологічних процесів, екологічного моніторингу та ін. На основі попереднього теоретичного обґрунтування доцільності використання мультиферментних систем у складі біоселективного елемента запропоновано новий алгоритм розробки електрохімічних біосенсорів для аналізу певних цільових речовин.

На основі різних варіантів поєднання ферментативних реакцій розроблено низку мультиферментних біосенсорів, досліджено їх аналітичні характеристики та продемонстровано особливості функціонування залежно від комбінації ферментів в біоселективному елементі. Застосування розроблених мультиферментних біосенсорів для аналізу реальних зразків продемонструвало високий ступінь кореляції (на рівні  $R=0,93-0,99$ ) з даними традиційних методів аналізу.

**Теоретична та практична цінність роботи.** На основі одержаних експериментальних результатів створено діючі лабораторні прототипи низки біосенсорних приладів та запропоновано узагальнюючі технологічні схеми виготовлення цих пристроїв на основі мультиферментних біоселективних елементів.

Лабораторні прототипи мультиферментних біосенсорів апробовано на практиці під час аналізу біологічних, харчових, фармакологічних та



екологічних зразків. Успішний аналіз концентрацій речовин у реальних зразках з використанням лабораторних прототипів біосенсорів є безумовним підтвердженням працездатності останніх та можливості їх практичного використання. Проведено метрологічні дослідження, за результатами яких низку розроблених методик затверджено в ДП «Укрметртестстандарт», що є обов'язковим кроком на шляху до впровадження розроблених приладів.

Запропонований автором алгоритм розробки мультиферментних електрохімічних приладів дає змогу іншим дослідникам суттєво скоротити витрати часу та кошти на проведення аналогічних досліджень.

*Достовірність та ступінь обґрунтованості результатів роботи* забезпечений глибоким аналізом автором сучасного стану проблеми, про що свідчить наведений у огляд літератури (понад 300 посилань, з яких 90 % іноземних авторів). Усі експериментальні результати, наукові положення і висновки побудовані на матеріалах власних досліджень. Їх **достовірність** визначається достатньою кількістю експериментальних досліджень, застосуванням для вирішення поставлених задач широкого спектру сучасних біохімічних, біотехнологічних, фізико-хімічних, а також математичних методів із застосуванням новітніх комп'ютерних програм для статистичної обробки результатів.

Значна частина результатів, які зумовлюють наукову значимість роботи, отримана Солдаткіним О.О. самостійно і є важливою для подальшого розвитку біосенсорних технологій і суміжних галузей науки і техніки. Отримані автором дані добре узгоджуються з результатами інших дослідників, а також результатами, одержаними з використанням інших методів досліджень. Отже, наукові положення та висновки Солдаткіна О.О., які наведені у дисертації, є обґрунтованими, та є узагальненням великої кількості результатів, що задовольняють критеріям наукової новизни, достовірності та практичного значення. Результати досліджень захищені 5 патентами України на корисну модель та винахід.



Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій підтверджено їх обговоренням на вітчизняних і міжнародних наукових конференціях.

**Оцінка змісту дисертації.** Структура дисертаційної роботи Солдаткіна О.О. традиційна, складається із усіх необхідних розділів. Роботу викладено на 378 сторінках машинописного тексту. Експериментальний матеріал дисертації подано у вигляді 108 рисунків та 25 таблиць.

Розділ «**Вступ**» містить характеристику актуальності вибраної теми, мети і завдань дослідження, наукової новизни отриманих результатів, їх практичного значення, особистого внеску автора дисертації, матеріалів щодо апробації роботи.

**Розділ 1** складається з 6 підрозділів і присвячений аналізу даних літератури щодо проблеми, якій присвячена дана дисертаційна робота. Автор добре орієнтується в масиві інформації стосовно існуючих підходів використання мультиферментних систем при розробці електрохімічних біосенсорів.

**Розділ 2** присвячений характеристиці об'єктів дослідження, використаних в роботі матеріалів та методів. При виконанні експериментів автором використані сучасні і в той же час добре апробовані методи, що дозволило отримати нові дані, які мають теоретичне і практичне значення.

Ознайомлення з цим розділом дає змогу зробити висновок про те, що автор добре володіє сучасними фізико-хімічними та біотехнологічними методами, а арсенал використаних методів свідчить про комплексний підхід до вирішення поставленої мети.

Результати власних експериментальних досліджень дисертанта наведені в **розділах 3-5**.

Дисертантом отримані такі основні результати:

**Розділ 3:** обґрунтовано та розроблено нові універсальні методики перевірки параметрів кондуктометричних та амперметричних



перетворювачів для проведення відбору перетворювачів з найкращими характеристиками для виготовлення мультиферментних біосенсорів. Запропоновано методики вибору схем вимірювання та приладів електрохімічного аналізу під час розробки біосенсорів, що дає змогу скоротити тривалість попередньої перевірки електрохімічних перетворювачів та вибору схем вимірювань при розробці мультиферментних біосенсорів.

**Розділ 4:** проаналізовано кілька варіантів електрохімічних біосенсорів на основі конкурентних або послідовних ензиматичних реакцій для прямого аналізу речовин, а також інші мультиферментні біосенсори для непрямого визначення аналітів. Наведено низку успішних розробок різних мультиферментних біосенсорів. Проведено аналіз переваг та недоліків відповідного типу біосенсора порівняно як з моноферментними, так і з іншими мультиферментними біосенсорами. Незважаючи на те, що використання у складі біоселективного елемента кількох ферментів ускладнює процедуру розробки біосенсора, проте мультиферментні системи мають ряд суттєвих переваг. Так, у багатьох випадках застосування моноферментних біосенсорів для визначення певних цільових речовин є неможливим. Крім того, поєднання кількох ферментів забезпечує високу селективність, чутливість та стабільність біосенсорів.

**Розділ 5:** функціонування створених в роботі лабораторних прототипів біосенсорів проаналізовано щодо перспектив їхнього практичного використання, а розроблені мультиферментні біосенсори були апробовані рід час роботи з реальними зразками. Результати біосенсорних аналізів корелювали з даними стандартних традиційних методів.

Одержані автором експериментальні результати відповідають меті роботи і науковим завданням, вони викладені логічно і послідовно, підтверджені необхідним ілюстративним матеріалом, є науково обґрунтованими і достовірними.



Після детального ознайомлення з роботою, яка є завершеним дослідженням, спрямованим на вирішення складної наукової задачі, хочеться побажати автору успіхів у сфері практичного застосування виявлених закономірностей та явищ.

***Зауваження до роботи:***

Частину матеріалу викладено без наведення і обґрунтування передумов досліджень, наприклад (розділ «Дослідження та оптимізація перетворювачів і вимірювальних схем»):

1. Чому для покращення селективності амперометричних перетворювачів застосовували поліфенілендіамінову (ПФД) мембрану ? (с. 139).

2. Чому наразі є потреба у створенні методики попереднього аналізу параметрів кондуктометричних перетворювачів? (с.157)

3. Чому для виконання першого етапу тестування кондуктометричних перетворювачів (дослідження чутливості) використовували метод електрохімічної імпедансної спектроскопії? (с.159)

4. Залишається незрозумілим, які з запропонованих підходів, що використовуються в методиках тестування електрохімічних перетворювачів, є загальновідомими, а які розроблені дисертантом?

5. У розділі «Розробка біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій для прямого визначення субстратів» автор зазначає: «На прикладі відповідних біосенсорів ми акцентуємо увагу на найбільш важливих етапах розробки різних біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій». І які ж етапи є найважливішими? Їх слід було виділити, щоб акцентувати увагу.

6. У розділі 5 «Застосування мультиферментних біосенсорів для роботи з реальними зразками та верифікація отриманих результатів» не наведено походження реальних зразків і обґрунтування вибору референтних методів для порівняння з біосенсорним аналізом. Навряд чи на підприємствах



харчової галузі вміст лактози у молоці, а також концентрацій глюкози та сахарози в напоях вимірюють за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. Можливо як референтні слід було використовувати методи, якими користуються на підприємствах.

7. У розділі «Аналіз та узагальнення результатів» наведено схему методики розробки мультиферментних електрохімічних біосенсорів, проте незрозуміло, що саме розроблено та запропоновано дисертантом, а що відомо з літератури.

8. Деякі висновки (наприклад, 3 і 5) є занадто довгими та перевантаженими цифровим матеріалом.

Проте слід зазначити, що вказані зауваження можуть бути предметом для обговорення на захисті, але вони не знижують загальний високий науковий рівень дисертаційної роботи О.О. Солдаткіна, основні положення якої не викликають сумніву. Матеріали роботи достатньо повно відображені в публікаціях високого рівня, а автореферат адекватно відображає структуру дисертації, її зміст та основні висновки. Дисертаційна робота Солдаткіна О.О. є завершеним науковим дослідженням, результати якого можуть бути використані для цілеспрямованої розробки, оптимізації та ефективного використання елементів та систем сенсорної техніки різноманітного призначення.

Основні наукові результати відображені у 31 статті, опублікованих у фахових вітчизняних та закордонних наукових виданнях, з яких 14 у журналах науко-метричних баз Scopus та Web of Sciences з високим імпаکت-фактором (Analytical Chemistry, IF 6.042; Analytical Chimica Acta, IF 5.123; Talanta, IF 4.244; Bioelectrochemistry, IF 3.789; Nanoscale Research Letters, IF 3.411), а також у 34 тезах доповідей на наукових конференціях і в 5 патентах України на корисну модель та винахід.

#### ***Загальний висновок***

Головним досягненням даної дисертаційної роботи є те, що



дисертантом вперше проаналізовано, обґрунтовано та поетапно сформульовано методологію проектування, розроблення, виготовлення та подальшого застосування різних варіацій мультиферментних систем (послідовні каскади ферментативних реакцій, конкуренція за субстрат, паралельні реакції, інгібування ферментів та ін.) при створенні біоселективних елементів електрохімічних біосенсорів. На основі цієї методології сформульовано основні переваги та обмеження, що можуть бути використані іншими дослідниками при розробці та створенні нових мультиферментних електрохімічних біосенсорів.

Дисертаційна робота «Основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів», представлена Солдаткіним Олександром Олексійовичем на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук, є завершеною науковою працею, в якій науково обґрунтовано та розроблено фундаментальні та технологічні основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів широкого спектру застосування.

Актуальність тематики, високий методичний рівень проведених досліджень, наукове й практичне значення отриманих результатів дає змогу зробити висновок, що робота Солдаткіна О.О. відповідає вимогам до докторських дисертацій, зокрема пп. 9 та 10 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (із змінами), а її автор заслуговує на присудження йому наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Доктор біологічних наук,  
професор, завідувач кафедри біотехнології  
мікробного синтезу Національного університету\*  
харчових технологій



Пирог Т.П.