

*Голові спеціалізованої вченої ради Д 26.233.01  
із захисту дисертацій на здобуття  
наукового ступеня доктора наук  
Інституту мікробіології і вірусології  
ім. Д. К. Заболотного НАН України,  
доктору біологічних наук, професору,  
академіку НАН України  
Співаку Миколі Яковичу*

## ВІДГУК

офіційного опонента – доктора біологічних наук, професора,  
професора кафедри загальної медицини з курсом фізичної терапії  
Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Воронкової Ольги Сергіївни  
на дисертацію Борзової Наталії Вікторівни  
на тему: «Поширення та функціональні особливості глікозидаз у  
мікроорганізмів різних таксономічних груп»,  
подану до захисту на здобуття ступеня доктора біологічних наук  
за спеціальністю 03.00.07 Мікробіологія, 091-Біологія

### **Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження**

Сучасне суспільство переживає період продовольчої кризи, що потребує негайного вирішення. Це у свою чергу вимагає розробки підходів, які б могли якісно, безпечно та ефективно трансформувати різні види сировини у продукти, необхідні для промисловості. У цьому сенсі мікробна біотехнологія відкриває найширші перспективи, адже мікроорганізми мають найширший спектр ферментів, які потрібні людині. Вони легко включаються у промислові процеси, можна оптимізувати умови їх культивування для досягнення найкращого ефекту, препарати можна отримувати у високих кількостях, очищувати, стабілізувати,

зберігати тривалий час без втрати активності. Такі препарати не становлять ризиків для здоров'я людини та довкілля, дозволяють здешевити технологію отримання продуктів та покращити їх властивості.

Мікробні глікозидази займають у виробничих процесах особливе місце, адже це ферменти вуглеводного обміну, який притаманний для всіх живих істот. Вони каталізують розщеплення цукрів, які є недоступними і збільшують їх вихід у сировині. Також можливе їх застосування для терапії розладів травлення, у трансплантології, для отримання сполук з імуномодулюючим ефектом, засобів для лікування захворювань серцево-судинної системи.

Зважаючи на те, що ферменти завжди відрізняються за активністю, а їх продуценти мають різні вимоги до культивування, абсолютно необхідним є аналіз цих властивостей і вимог для оптимізації можливостей вибору ферментів для промисловості та медицини. Саме це визначає актуальність теми дисертаційної роботи, яка дає грунтовне уявлення про один з найбільших класів ферментів.

### **Зв'язок наукової роботи з науковими планами, темами**

Дисертаційні дослідження виконані в рамках напрямку науково-дослідних робіт відділу біохімії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Вони є частиною досліджень за темами: «Дослідження молекулярних основ функціональної та біологічної активності полімерів (ліпо-, полісахаридів, ферментів) мікробної клітини» (№ держреєстрації 0103U0005876, 2002-2007 pp.), «Мембрани та позаклітинні глікополімери мікроорганізмів: біохімічні і молекулярно-біологічні властивості» (№ держреєстрації 0108U002094, 2008-2012 pp.), «Структурно-функціональна характеристика протеому і глікому мікроорганізмів – продуcentів ензимів і гліканів» (№ держреєстрації 0113U001217, 2013-2017 pp.), «Функціональні, біологічні та фізико-хімічні властивості мембраних та позаклітинних макромолекул мікроорганізмів та їх залежність від особливостей первинної структури» (№ держреєстрації 0118U000214, 2018-2022 pp.) та цільової

комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (2010-2014 рр.) за темою «Протеази і глікозидази мікроорганізмів як основа нових медичних препаратів пролонгованої дії».

### **Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації**

Формулювання мети та постановка задач є відповідними темі дисертаційного дослідження. Методи, обрані для вирішення задач, адекватні, сучасні, інформативні. У роботі представлено широкий спектр мікробіологічних, біохімічних, хроматографічних, спектрофотометричних методів, методів інгібіторного аналізу та препаративної хімії, комплексне застосування яких забезпечує повноту та високий рівень надійності результатів. Використані статистичні методи підтверджують достовірність результатів.

Отримані результати мають наукову новизну та конкретне практичне значення, можуть бути рекомендовані до впровадження у виробничі цикли біотехнологічної промисловості.

Всі висунуті на захист наукові положення та практичні рекомендації є обґрунтованими, висновки добре аргументовані та походять з суті проведених досліджень.

### **Структура дисертаційної роботи**

Дисертаційну роботу викладено на 399 сторінках тексту, вона містить 53 таблиці та 145 рисунків. Текстова частина роботи включає розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи» та 7 розділів результатів власних досліджень, а також «Аналіз та узагальнення результатів» і «Висновки». Список використаної літератури включає 489 джерел.

У розділі «Вступ» наведено коротку характеристику роботи, окреслено актуальність питання, показано взаємозв'язок з програмами та темами наукових досліджень, наведені мета та завдання роботи, коротко подано основні тези про

новизну та практичне значення отриманих результатів. Наводиться інформація про апробацію роботи та особистий внесок здобувача.

У першому розділі – «Огляд літератури» – представлено вичерпний огляд матеріалів з наукових джерел. Представлено повний огляд відомостей про глікозидази мікроорганізмів, їх розповсюженість, властивості та практичне значення. Представлення інформації відбувається у логічній послідовності, що дозволяє вповні оцінити стан питання та отримати всебічне уявлення про досліджувану проблему. Наведений ілюстративний та табличний матеріал є доречним: дозволяє отримати чітку візуалізацію питання та структурувати його компоненти. Згадуються мікроорганізми-продуценти глікозидаз, їх особливості та різноманіття, параметри, що важливі для промислового застосування, технологія виділення та відомі сфери практичного застосування. Матеріал розділу є вичерпним і дозволяє чітко окреслити необхідність досліджень, виконаних здобувачкою досліджень та їх новизну.

Другий розділ роботи, присвячений опису методів дослідження. Він містить детальний опис об'єктів досліджень та всіх застосованих методів, зокрема: методів культивування продуцентів ензимів (мікробіологічні методи), виділення та очищенння самих ферментів (фракціонування, хроматографія, гель-фільтрація, електрофорез), визначення їх властивостей (комплекс біохімічних методів). Також використані розрахункові методи визначення кінетичних параметрів. З метою впровадження у промисловість проведено дослідження впливу факторів реакційного середовища на активність ензимів, що включало оцінку температурного впливу, дії різноманітних хімічних сполук, встановлювали чутливість до протеолітичних ферментів, УФ-опромінення тощо. Також вивчали можливості хімічної модифікації глікозидаз аніонами, катіонами та групоспецифічними реагентами, координаційними сполуками металів. Окремо надано опис методів стабілізації глікозидаз та їх отримання препаративних форм (зокрема, іммобілізованих ферментів). Окремо представлена методики вивчення активності різних груп ензимів щодо різних субстратів. Для статистичної обробки даних обрані коректні методи.

У третьому розділі – «Особливості розповсюдження та умови продукції глікозидаз у мікроорганізмів різних таксономічних груп» – наведено результати скринінгу 1330 штамів мікроорганізмів: 801 мікроміцет, 275 дріжджів, 254 бактерій. Всі культури були перевірені на здатність проявляти  $\alpha$ -галактозидазну та  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність та здатність до продукції деяких інших типів глікозидаз. Визначено, що частка активних штамів, що проявляють принаймні одну з досліджуваних активностей склала 45 %. Показано, що це переважно мікроміцети (53 % активних культур).

Показано, що джерело виділення може мати істотне значення при виявленні продуцентів ензимів. Так, вказується, що найбільш активні культури мікроміцетів були виділені з лісового ґрунту, а також харчових та промислових відходів (переважно представники роду *Penicillium*). Також відмічено, що «законсервовані» штами є менш активними порівняно з такими, що є свіжовиділеними.

З практичної точки зору цінним є такий результат: термофільні гриби є активними продуцентами шуканих ферментів (94 % штамів виявляли хоча б одну активність), що дозволяє синтезувати ензими у середовищі при підвищених температурах, а це потенційно забезпечує зниження ризиків небажаної контамінації технологічних апаратів.

Відмічається, що серед дріжджів відсоток активних продуцентів у середньому був нижчим, ніж серед нитчастих грибів, але має місце значна різниця між видами. Так, найбільш активними є дріжджі роду *Pichia* (76 % штамів продукують ензими досліджуваної групи), а найменш продуктивні – *Debaryomyces* (продукцію підтверджено лише у 13 % штамів). Особливу увагу привертає рід психротолерантних дріжджів *Rhodotorula*, які ферменти яких можуть розглядатися як перспективні для переробки відходів з огляду на їх спектр та температурний оптимум.

Серед бактерій найбільш активними продуцентами визначені представники *Alteromonas*. У перспективі ці мікроорганізми можуть бути цікаві з точки зору боротьби із забрудненням світового океану. Бактерії екстремальних екосистем

виявилися найменш продуктивними, але саме в цих дослідженнях отримала чіткого підтвердження концепція про залежність ензиматичної активності культури від джерела виділення.

У четвертому розділі – «Виділення і характеристика  $\alpha$ -L-рамнозидаз і  $\alpha$ -галактозидаз мікроміцетів і дріжджів» – наводиться вичерпна інформація про характеристики вказаних ензимів, наводиться авторська схема їх виділення й очищення з досягненням стовідсоткового результату, що є частиною практичного значення роботи і може бути впроваджено у цикли промислових процесів.

Виконаний аналіз амінокислотного та моносахаридного складу глікозидаз показав, що при всій їх варіативності існує певна подібність ензимів у різних видів бактерій і в той же час істотні відмінності можуть спостерігатися для одних і тих самих ферментів у різних штамів одного виду, що вказує на потенційно різні характеристики і необхідність ретельного скринінгу ферментів.

У рамках практичної цінності найбільш вагомими є дослідження термооптимуму функціонування ферментів, що дозволяє зорієнтуватися щодо галузей їх можливого застосування, наприклад, харчова промисловість або переробка відходів. Показано, що ензими з найменшим відсотком глікозилювання є найбільш термостійкими та, навпаки, зі збільшенням відсотку глікозилювання термостійкість знижується, що може бути покладено в основу подальшої модифікації ферментів задля досягнення бажаних властивостей. Також показано, що досліджувані ензими є більш стабільними у кислій зоні pH (4-6), хоча  $\alpha$ -L-рамнозидази грибного походження можуть бути луготолерантними. Відмічена і висока стійкість  $\alpha$ -галактозидаз грибів до протеїназ (за винятком випадків посилення протеолізу в умовах термообробки) та УФ-опромінення.

У п'ятому розділі – «Вплив глікозилювання на секрецію, каталітичну активність і стабільність  $\alpha$ -галактозидаз мікроміцетів» – висвітлено питання хімічної модифікації глікозидаз та можливостей використання цих реакцій для оптимізації ферментативних функцій. Застосовані підходи свідчать про те, що

модифіковані різними шляхами ферменти змінюють активність за різних умов їх використання, що відкриває широкі можливості для спрямованого керування біотехнологією мікробних ензимів з метою отримання ферментів під конкретні умови технологічної схеми. Зокрема, можуть бути враховані вимоги до pH середовища, температури, іонного оточення тощо, що врешті може здешевити процес отримання основної продукції і дозволити знизити її кінцеву вартість.

У шостому розділі – «Кінетика і механізм інактивації глікозидаз» – наведено результати, що демонструють активність ферментів та можливості їх регуляції. Зокрема, показані можливості інгібування як субстратами, так і продуктами реакції, причому різні сполуки-інгібітори мають різну інтенсивність ефекту і це варіації у дуже широкому діапазоні.

Окреме вивчення термоінактивації ензимів дозволило отримати результати, які можуть бути застосовані для розробки підходів до їх термостабілізації шляхом пригнічення первинних обертних стадій денатурації. Запропоноване внесення нейтрального протеїну дозволяє забезпечити захисний ефект зокрема для  $\alpha$ -галактозидаз грибного походження до температури 55-65 °C, яка може стати запорукою захисту промислових процесів від бактеріальної контамінації. Також на прикладі рамнозидази *E. erubescens* показано можливість контролю активності фермента за рахунок зміни іонної сили розчину, що дозволяє контролювати конформацію, а отже, активність фермента.

У сьомому розділі – «Стабілізація глікозидаз хімічними методами» – представлено результати вивчення ефективності різних підходів для стабілізації ферментів, що є необхідним для їх застосування у технологічних схемах промислових процесів. Це мають бути контролювані умови, адже штучне середовище, в якому буде працювати фермент не є таким, як природне, але на відміну від нього може бути контролюваним для досягнення максимальної ефективності препаратів. Відзначено, що найбільш чутливими глікозидази є до впливу катіонів металів, однак, ця чутливість є варіабельною залежно від ферменту та інших супровідних умов. Найбільш чутливими всі досліджені глікозидази були до іонів  $Hg^{2+}$  та  $Ag^+$  (інактивація на 40-100 %). Також показано

інгібування активності більшості ферментів за умов дії різних органічних сполук – агнтів тіосульфідного обміну та координаційних сполук металів. Зокрема, показано високу чутливість рамнозидаз до координаційних сполук германію і стійкість до інгібування цими сполуками для  $\alpha$ -галактозидаз.

Врешті, показано, що модифікація функціонально активних залишків амінокислот (аспарагінової або глутамінової кислоти, гістидину, цистеїну) призводить до інактивації досліджуваних глікозидаз і розробка підходів до їхнього захисту сприятиме стабілізації фермента. Загалом, отримані результати є базисом для одержання модифікованих препаратів  $\alpha$ -галактозидаз та  $\alpha$ -L-рамнозидаз технологічного призначення.

У восьмому розділі – «Отримання препаратів глікозидаз пролонгованої дії» – наведено результати розробки препаративних форм препаратів для впровадження у промислові процеси. Показано, що інкапсульована (ліпосомна) форма за певних умов дозволяє зберегти ферментативну активність на тому ж рівні, що і у вихідного ензима, але може мати місце і зниження до 50 %. Але перевагою є більша стабільність ферментів в умовах змін pH та температури.

При застосуванні технології зшитих ензимних агрегатів встановлено підвищення темостабільності: такі форми ферментів залишаються активними навіть за температур 60-75 °C, що робить їх дуже привабливими для харчових підприємств, де високі температури використовуються для деконтамінації сировини.

У дев'ятому розділі – «Субстратна специфічність глікозидаз» – досліджуються потенційні точки впровадження цих ферментів у промислові процеси. Переважна їх більшість належить до сфери переробки сировини, яка надалі може бути застосована для виготовлення різних продуктів. Зокрема, особливий інтерес ці ферменти представляють для переробки рослинної сировини для харчової і фармацевтичної промисловості, а також для переробки відходів.

Для  $\alpha$ -L-рамнозидаз визначено доволі широкий спектр субстратів, які вони можуть ефективно переробляти, перетворюючи ці речовини на корисні для

організму людини сполуки, які входять до складу продуктів функціонального харчування. На прикладі пектину підібрані оптимальні режими роботи ферментів, що може бути впроваджено у технологічні схеми при виробництві таких харчових продуктів як соки та плодово-ягідні пюре.

Для  $\alpha$ -галактозидаз визначено вужчий спектр активності по відношенню до субстратів, однак, швидкість роботи цих ферментів дуже висока. На прикладі соєвого молока показано більш ефективне накопичення галактози та сахарози при його інкубації з ферментом. При цьому сам фермент легко інактивується при нагріванні. Все це вказує на широкі перспективи щодо можливого застосування у харчовій промисловості та у медицині для профілактики проблем травлення, пов'язаних з непереносимістю деяких продуктів.

Розділ «**Аналіз і узагальнення результатів**» є ґрунтовним та вичерпним: наводиться обговорення отриманих результатів у порівнянні з відомими даними, що ще раз дозволяє відмітити новизну результатів, які суттєво доповнюють відому інформацію. У розділі чітко представлені узагальнюючі положення, що відповідають загальній меті роботи, зокрема, у частині практичного застосування ферментів вказаних груп. Насамкінець надається чітка схема проведеного аналітичного дослідження, яка приводить до конкретного практичного результату – пропозицій щодо застосування ферментів визначених мікроорганізмів у певних галузях промисловості та для дослідницької роботи.

Висновки лаконічні, походять з суті проведених досліджень, є повністю обґрунтованими матеріалами розділів експериментальної частини та дозволяють у логічний спосіб побачити комплексність результатів дослідження.

### **Достовірність та наукова новизна отриманих результатів**

Дисертаційне дослідження має системний характер, є комплексним, охоплює всі аспекти досліджені проблеми та відзначається високим рівнем наукової новизни. Дисерантка вперше зробила системний аналіз відомостей про

глікозидази та суттєво доповнила матеріали по відкритих питаннях. Всеобічний аналіз ферментного ряду, їх властивостей, можливостей модифікацій, добору умов оптимізації функціонування та розробка пропозицій щодо промислового використання вказують на дуже високий науковий рівень роботи.

Представлені матеріали ретельно оброблені за допомогою методів статистичного аналізу, що дозволяє пересвідчитися у їх достовірності та побачити переваги порівняно з існуючими аналогами.

### **Теоретичне та практичне значення отриманих результатів**

Результати дисертаційної роботи мають вагоме теоретичне і практичне значення. Фактично ми маємо повний опис групи глікозидаз, починаючи від можливостей їх скринінгу у різних групах живих організмів, до можливостей їх штучної модифікації та впровадження у промислові процеси. Зокрема, є конкретні дослідження до такої ключової сировини харчової промисловості як пектин, що входить до складу самих різних товарів дитячого харчування та функціональних продуктів для дорослих. У роботі є опис підходів до модулювання активності ферментів, що його розкладають і це цілком може бути взято за основу оптимізації технологічних схем харчових продуктів. Практичне значення також підтверджується наявністю в авторки трьох патентів.

Крім того, результати дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес для викладання дисциплін «Харчова біотехнологія», «Технологія мікробного синтезу лікарських засобів клітин» та «Іммобілізовані ферменти і клітини в біотехнології» в Національному університеті харчових технологій на кафедрі біотехнології та мікробіології, що підтверджується актом впровадження.

### **Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях**

За темою дисертації опубліковано 82 наукові праці, в тому числі 45 статей у фахових виданнях (33 Indexed in Scopus), 3 патенти на корисну модель та 1 монографія.

## **Оцінка змісту дисертації**

Дисертаційна робота містить всі частини, які повинні бути відповідно до вимого її оформлення, а саме: вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати експериментальних досліджень (7 підрозділів), аналіз та узагальнення отриманих результатів, а також висновки і додатки. Представлені анотації українською та англійською мовами, які містять короткий виклад основних результатів дослідження та не містять даних, які були б відсутні в основному тексті роботи. Оформлення анотацій також відповідає діючому Порядку присудження наукових ступенів.

З аналізу змісту дисертації мною, як офіційним опонентом, відмічається дотримання норм академічної добroчесності в повному обсязі. Робота містить посилання на згадані у тексті джерела інформації, автором дотримано вимоги норм законодавства про авторське право, надано повну інформацію про результати наукової діяльності, а також використані методи досліджень.

## **Дискусійні положення, запитання та побажання щодо змісту дисертації**

До викладених у дисертаційній роботі матеріалів, їх аналізу та сформульованих висновків принципових зауважень немає, але до дисертантки є ряд запитань та невеликих зауважень. В рамках дискусії хотілося би отримати відповіді на запитання:

1. Що означає термін «Гліколітична специфічність культур» (стор. 139)?
2. Відзначено (рис. 3.8, табл. 3.7), що найвужчий спектр ферментів відзначався у чорних дріжджів, а найширший – у червоних. Отже, чи є взаємозв'язок між пігментом та біосинтезом ферментів? За рахунок чого?
3. Якщо зростання ензиматичної активності глікозидаз тривало аж до 7 доби, хоча інтенсивність накопичення білків має пікові показники раніше, чи не означає це, що ферменти низькоефективно утилізують специфічний субстрат і не матимуть перспектив для впровадження?
4. Чи можна виділити якісь універсальний субстрат, який би міг забезпечити швидку оцінку потенціалу штаму в якості продуцента глікозидаз?

5. Який оптимальний вміст вуглеводів у складі глікозидаз, що відповідав би максимальній активності ферmenta у максимально широкому діапазоні? Чи можна таке значення розрахувати та модифікувати конкретний фермент під нього?

6. Стор. 197: «Це свідчить про присутність в середовищі мономерів (або димерів?), здатних до оборотної ренатурації». Чому стойть знак запитання?

Серед зауважень можна відмітити, що у тексті роботи зустрічаються технічні орфографічні помилки. Також мають місце великі фрагменти елементів обговорення в експериментальних розділах, але ці зауваження не носять принципового характеру, не стосуються концепції дисертаційного дослідження і не впливають на його загальну високу оцінку.

### **Загальний висновок та оцінка дисертації**

Дисертаційна робота Борзової Наталії Вікторівни «Поширення та функціональні особливості глікозидаз у мікроорганізмів різних таксономічних груп» є самостійним, завершеним науковим дослідженням.

Актуальність обраної теми, обґрутованість наукових положень, висновків та запропонованих рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність та наукова новизна, повнота їх викладу в опублікованих працях свідчать про високий рівень підготовленої роботи. У роботі теоретично обґрутовано та експериментально підтверджено можливості отримання високоекективних препаратів мікробних глікозидаз для застосування у різних галузях промисловості.

Вважаю, що дисертаційна робота Борзової Наталії Вікторівни «Поширення та функціональні особливості глікозидаз у мікроорганізмів різних таксономічних груп» оформлена відповідно до вимог наказу Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», відповідає вимогам Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого постановою Кабінету міністрів

України від 17 листопада 2021 р. № 1197, а її автор Борзова Наталія Вікторівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук з наукової спеціальності 03.00.07 «Мікробіологія».

Доктор біологічних наук, професор,  
професор кафедри загальної медицини  
з курсом фізичної терапії  
Дніпровського національного університету  
імені Олеся Гончара

 Ольга ВОРОНКОВА

Вчений секретар  
Дніпровського національного університету  
імені Олеся Гончара

Тетяна ХОДАНЕН

