

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе  
Дмитриевой Марии Валерьевны на тему: «Электрокаталитические свойства  
белковых экстрактов, полученных из культуры *E.coli* ВВ», представленной  
на соискания ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 1.4.6 – Электрохимия

**Актуальность темы диссертации.** Биоэлектрокатализ – явление, которое лежит в основе работы современных биоэлектрохимических технологий: биосенсоров для контроля физиологически важных органических веществ и активно развиваемых биотопливных элементов. Процессы, протекающие в этих устройствах, происходят при участии биологических объектов – ферментов или живых микроорганизмов. Интерес к биокатализаторам обусловлен не только большой скоростью реакций с их участием, но и высокой селективностью биокатализаторов.

Осуществление эффективного биоэлектрокатализа требует сопряжения ферментативной и электрохимической реакций. Наиболее перспективным для практики представляется прямой биоэлектрокатализ, заключающийся во взаимодействии фермента с электродом, однако до сих пор известно лишь небольшое количество ферментов и микроорганизмов, которые способны взаимодействовать с электродом напрямую в широком интервале концентраций субстрата. В настоящее время преимущественно используют медиаторный биоэлектрокатализ, в котором перенос электронов от фермента или живой клетки к электроду происходит через введенную в систему или образующуюся в ходе метаболизма микроорганизма обратимую редокс-пару.

Основной проблемой использования чистых ферментов для осуществления биоэлектрокатализа является продолжительная и сложная процедура их выделения и очистки и неполное окисление ими субстрата. Живые микроорганизмы являются весьма перспективными в этом смысле, однако их практическое внедрение ограничено сложностью изучения процессов, протекающих при их «сборке» в электроактивный слой на электроде, цикличностью процесса работы, связанной с естественным метаболизмом и жизненным циклом клеток, изменением производительности при изменении внешних условий. Промежуточной системой между живыми микроорганизмами и чистыми ферментами являются ферментные каскады – совокупность ферментов, способных более полно перерабатывать субстраты. В настоящей работе рассматривается особый тип биоэлектрокатализаторов, до сих пор не описанный в литературе: грубые белковые экстракты, полученные разрушением клеток бактерий без дальнейшего деления и очистки, что привлекательно для практического использования. Такие

системы являются аналогом ферментативного каскада, и отличаются простотой получения. В качестве основного модельного объекта был выбран микроорганизм *Escherichia coli* ВВ (*E. coli*). В этой связи тема представленной диссертационной работы Дмитриевой М. В. является **актуальной**.

**Целью диссертационной работы** являлось определение закономерностей биоэлектrokаталитического окисления субстратов (глюкоза, цитрат) белковыми экстрактами из *E. coli*.

Для достижения цели работы соискателем решались **следующие задачи**:

1. Изучение влияния условий получения белковых экстрактов из штамма *E. coli* ВВ на их дегидрогеназную активность.
2. Определение влияния фазы роста культуры микроорганизма и природы субстрата (глюкоза, этиловый спирт, яблочная кислота, молочная кислота, лимонная кислота) на дегидрогеназную активность белковых экстрактов из штамма *E. coli* ВВ.
3. Определение основных закономерностей кинетики медиаторного биоэлектрохимического окисления глюкозы полученными экстрактами.
4. Установление влияния природы редокс-медиатора, рН, природы буферного раствора и его ионной силы, температуры и концентрации реагентов, природы субстрата на электрохимическую активность полученных экстрактов.

**Структура диссертационной работы.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, основных выводов и заключения, списка литературы. Работа изложена на 189 страницах, содержит 57 рисунков и 32 таблицы. Список литературы включает 251 библиографическое наименование.

**Плановый характер работы.** Исследования по теме диссертации выполнены в рамках тематической карты ФИЦ ПХФ и МХ РАН (АААА-А19-119061890019-5, 124013000692-4).

Работа дважды поддержана стипендией Президента РФ (№ СП-2619.2018, № СП-5461.2021.1).

**Научная новизна диссертационной работы.**

1. Впервые грубые белковые экстракты, полученные ультразвуковым разрушением клеток модельной культуры *E. coli*, использованы в качестве объекта для биоэлектrokаталитического окисления различных субстратов (глюкоза, цитрат калия). Показана применимость разработанного подхода к получению аналогичных биоэлектrokатализаторов из принципиально иного класса микроорганизмов, *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Получены данные о дегидрогеназной активности белковых экстрактов клеток *E. coli* на разных стадиях роста культуры в присутствии различных субстратов с использованием хлорида трифенилтетразолия в качестве акцептора электронов (ТТХ-активность). Показано, что в период экспоненциального роста бактерий наибольшая ТТХ-активность наблюдается при использовании глюкозы и изоцитрата калия в качестве субстратов. Предложен способ оценки дегидрогеназной активности спектроскопическим методом по кинетике восстановления феррицианида калия в контакте с белковым экстрактом, позволяющий сократить время эксперимента.

3. Доказан медиаторный тип взаимодействия белковых экстрактов *E. coli* с инертным стеклоуглеродным электродом в ходе биоэлектродокаталитического окисления глюкозы и цитрата калия. Среди изученного ряда известных растворимых редокс-медиаторов наибольшие токовые отклики получены с бензохиноном, метиленовым синим и гексацианоферратом (III) калия. Показано, что при выборе редокс-медиаторной системы помимо известных параметров (редокс-потенциал, совместимость с биообъектом) необходимо также учитывать наличие конкурирующих редокс-процессов между медиатором и компонентами среды.

4. Получена совокупность экспериментальных данных, отражающая влияние состава, ионной силы и pH буферного раствора, температуры на дегидрогеназную активность и на эффективность процесса биоэлектродокаталитического окисления глюкозы исследуемыми грубыми белковыми экстрактами. На основании полученных результатов выявлены оптимальные условия для получения белковых ферментативных экстрактов с максимальной активностью и условия проведения биоэлектродокаталитического окисления глюкозы с максимальными токовыми откликами.

5. Изучены особенности кинетики медиаторного биоэлектродокаталитического окисления глюкозы исследуемыми экстрактами (медиатор – феррицианид калия). Лимитирующей стадией процесса является взаимодействие ферментов белкового экстракта с медиатором. Найдены основные кинетические параметры процесса (максимальная скорость, эффективная константа скорости реакции, эффективная энергия активации). Кинетика процесса в избытке медиатора хорошо описывается уравнением псевдопервого порядка.

**Теоретическая значимость результатов работы.** В работе установлены закономерности медиаторного биоэлектродокаталитического

окисления глюкозы и цитрата калия белковыми экстрактами, полученными из культуры *E. coli* на различных стадиях роста. Определены основные оптимальные параметры осуществления этой реакции с максимальной скоростью. На примере исследуемой модельной системы показана принципиальная возможность использования белковых экстрактов в качестве альтернативы чистым ферментам или живым микроорганизмам для проведения биоэлектрокатализа. Иными словами, в работе решена важная для биоэлектрокатализа задача по установлению закономерностей осуществления медиаторной биоэлектрокаталитической реакции окисления глюкозы ферментативными экстрактами и выявлению ключевых параметров, влияющих на кинетику этой реакции.

**Практическая значимость результатов работы.** Предложен новый объект для осуществления биоэлектрокаталитического окисления субстратов (топлив) - белковые экстракты микроорганизмов, который демонстрирует аналогичные чистым ферментам электрохимические и каталитические характеристики.

Установлены основные факторы, определяющие эффективность электрокатализа с участием таких экстрактов: помимо природы медиаторной системы и субстрата, оптимальных температуры и pH среды, в качестве таких факторов также нужно учитывать концентрацию и тип буферной системы, инертность редокс-медиатора к компонентам раствора. В работе обоснован целый ряд методических решений, позволяющих повысить биоэлектрокаталитическую активность исследуемых белковых экстрактов. Предложена новая конструкция двухэлектродного биотопливного элемента с разделенными пространствами, позволяющая произвольно и независимо изменять состав биоанода.

#### **Методология и методы, использованные в диссертационной работе.**

Методологической основой диссертационного исследования послужили научные работы в области ферментативного электрокатализа, а также работы, описывающие кинетические и электрохимические закономерности окисления глюкозы дегидрогеназами. Для биохимической части экспериментов использованы классические методы и протоколы, применяемые для выращивания микроорганизмов, определения общего белка, дегидрогеназной активности. Для электрохимической части экспериментов использованы классические электрохимические методы и подходы. Предложен альтернативный метод оценки дегидрогеназной активности получаемых экстрактов и новая конструкция двухэлектродного асимметричного биотопливного элемента с разделенными пространствами, позволяющая произвольно и независимо изменять состав биоанода.



Обработка результатов экспериментов велась с использованием известных теоретических уравнений и статистических подходов. В работе использованы методы спектроскопии в УФ-видимом диапазоне, атомно-абсорбционного анализа, электрохимического анализа.

#### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Достоверность полученных в работе результатов обеспечивается использованием комплекса современных биохимических, физических и электрохимических методов исследования, получением воспроизводимых результатов при многократных повторениях эксперимента, а также непротиворечивостью полученных в работе результатов с данными, известными из научной литературы. Следует особо отметить высокий уровень микробиологической и биохимической подготовки соискателя.

По материалам диссертации опубликовано 29 печатных работ (общий объем 106 стр.), из них 7 статей в рецензируемых журналах, входящих в системы цитирования Scopus, RSCI, PubMed, ESCI, относящихся к категориям К1 и К2 на основании рекомендации ВАК от 21.12.2023 № 3-пл/1, 1 патент РФ, 21 тезис докладов на международных и российских конференциях различного уровня, имеется 1 подтвержденная заявка на патент.

Автореферат диссертации адекватно отражает содержание диссертационной работы.

Принципиальных замечаний нет. Однако при чтении диссертации возникают некоторые **вопросы, замечания и пожелания** в основном редакционного плана:

1. Название «грубый» белковый экстракт» не удачное. Лучше было бы «микробный белковый экстракт», или просто «белковый экстракт».

2. На стр. 25 не верно указана размерность мощности: мВ/см<sup>2</sup> вместо мВт/см<sup>2</sup>. Тоже и в таблице 2 (стр. 28).

3. В формулах (32) и (33) и в подписях к ним латинские символы нужно курсивить. Тоже касается и таблиц 22, 23, 24, 31, 32. В уравнениях реакций химические символы не курсивятся.

4. Имеются замечания и к оформлению «Списка цитируемой литературы». В основном он соответствует ГОСТ. Но в некоторых ссылках, в которых приведены сокращенные названия изданий, при сокращении не проставлены точки.


Однако эти замечания не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

На основании выше изложенного считаю, что диссертационная работа Дмитриевой М. В. на тему «Электрокаталитические свойства белковых экстрактов, полученных из культуры *E.coli* ВВ» по своей актуальности, научной новизне и практической значимости вносит существенный вклад в разработку методологии совершенствования биоэлектрохимических процессов и расширения потенциала их практического применения.

Диссертационная работа является завершенной научно-квалификационной работой, соответствующей по всем критериям Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. N 842 "О порядке присуждения ученых степеней" (с изменениями и дополнениями), а автор работы, Дмитриева М. В., заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.6 – Электрохимия.

Официальный оппонент:

профессор, доктор химических наук  
по специальности 02.00.05 – Электрохимия,  
заведующий кафедрой физической химии  
ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский  
государственный университет имени Н. Г. Чернышевского»

 Казаринов Иван Алексеевич

« 7 » июля 2024 г.

Адрес: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83

Тел.: 8 (8452) 51-64-13

E-mail: kazarinovia@mail.ru

