

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Дмитриевой Марии Валерьевны на тему «Электрокаталитические свойства белковых экстрактов, полученных из культуры *E. coli* ВВ», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.6. Электрохимия

Переход к экологически чистым и ресурсосберегающим технологиям, в том числе, в области химических источников тока, открыл перспективы для развития технологий биотопливных элементов, позволяющих получать электроэнергию за счет переработки топлив органического происхождения биокатализаторами. В рассматриваемой работе предлагается новый тип биоэлектрокатализаторов, так называемые грубые белковые экстракты. Такие экстракты получают из клеток микроорганизмов путем разрушения их клеточных мембран ультразвуком с последующим отделением белков центрифугированием. Подобные системы являются интересными для изучения, поскольку дезинтегрированная биомасса содержит каскад фермент-коферментных систем, участвующих в метаболизме микроорганизмов, что делает возможным более полное окисление топлива или окисление топлив сложного состава. Для наиболее широко используемой на практике медиаторной электродной системы в биотопливных элементах одной из актуальных задач является определение механизма и кинетики взаимодействия редокс-медиатора с биообъектом и поиск оптимальных условий функционирования таких источников. В связи с этим цель, поставленная в работе Дмитриевой М.В., является актуальной.

В работе Дмитриевой М.В. был получен ряд новых результатов, дающих определенный вклад в развитие биоэлектрохимии. К наиболее важным, на мой взгляд, можно отнести следующие:

1. Предложен новый тип биоэлектрокатализаторов (грубые белковые экстракты), ранее не описанный в литературе, содержащий в своем составе каскад ферментов и связанных с ними коферментных систем, что делает его привлекательным для практического использования объектом.
2. Впервые показана роль природы используемой для организации биоанода буферной системы в проявляемой им биоэлектрокаталитической активности.
3. Описаны закономерности кинетики исследуемого биоэлектрокаталитического процесса окисления глюкозы белковыми экстрактами, установлены основные факторы, влияющие на токовые характеристики, и предположена лимитирующая стадия биоэлектрокаталитического окисления глюкозы на медиаторном биоаноде.
4. Разработан прототип асимметричного биотопливного элемента с разделенными пространствами, позволяющий произвольно и независимо изменять состав биоанода, оставляя остальные компоненты системы неизменными, что является важным при сравнительном тестировании различных по составу биоанодов.

Полученные в работе результаты и сделанные заключения развивают представления об особенностях кинетики биоэлектрокаталитических процессов, в частности, о механизме и кинетике взаимодействия редокс-медиатора с биообъектом, что является теоретическим вкладом данной работы в понимание явления биоэлектрокатализа. Предложенный автором новый тип биоэлектрокатализатора, получаемый по простой технологии и содержащий в себе каскад ферментов, представляет собой привлекательный для практического использования объект.

Достоверность полученных в работе результатов обеспечивается применением комплекса современных биохимических, физических и электрохимических методов

анализа, согласованностью полученных результатов с известными из литературы. Работа прошла неоднократную апробацию в виде докладов на научных конференциях разного уровня, довольно полно опубликована в реферируемых журналах.

По материалам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, входящих в систему цитирования Scopus, RSCI, PubMed, ESCI, относящихся к категориям K1 и K2 на основании рекомендации ВАК от 21.12.2023 № 3-пл/1, 1 патент РФ.

Работа изложена на 189 страницах машинописного текста, содержит 57 рисунков и 32 таблицы, список цитируемой литературы насчитывает 251 библиографическое наименование. Работы автора, выполненные в соавторстве, процитированы в тексте диссертации. Автореферат в достаточной степени отражает основное содержание работы.

Структура работы является классической, состоит из 4 основных глав. Во *введении* обосновываются актуальность и степень разработанности темы, цель и задачи работы, излагаются новые результаты и положения, выносимые на защиту. Отмечается плановый характер работы, поддержанной тематической картой ФИЦ ПХФ и МХ РАН и стипендией Президента РФ. *Первая глава* представляет собой обзор современной литературы, основной упор в ней сделан на рассмотрение закономерностей ферментативного электрокатализа, приведена подробная классификация биоэлектрокаталитических систем и отражены области их применения. *Вторая глава* включает описание методов, используемых в работе, а также в ней описывается модель разработанного асимметричного биотопливного элемента, на котором проводились тестовые испытания биоанодов на основе предложенных в работе грубых экстрактов. *Третья и четвертая главы* посвящены изложению и обсуждению полученных в работе результатов. В третьей главе основной упор сделан на изучение дегидрогеназной и электрохимической активностей, получаемых экстрактов, в зависимости от условий их синтеза. Автор определяет оптимальные условия синтеза экстрактов с целью получения их максимальной активности. В четвертой главе приведены результаты исследования электрохимической активности экстрактов в составе медиаторного биоанода, в частности, рассматриваются вопросы влияния редокс-медиатора, состава рабочего раствора, типа субстрата и т.п. на получаемые токовые характеристики. Подробно описываются результаты, позволяющие уточнить кинетику изучаемого биоэлектрохимического процесса. Описаны тестовые испытания разработанного прототипа асимметричного биотопливного элемента с различными анодными материалами и экстрактами из разных культур микроорганизмов. В *Заключении* суммированы основные результаты и сделаны выводы по работе.

В целом работа Дмитриевой М.В. изложена логично, обладает внутренним единством, выдвинутые на защиту положения и сделанные заключения выглядят вполне обоснованными. Работа, выполнена на высоком научном уровне, но при ее прочтении возникает ряд замечаний:

1. В заключении к главе 3 сделан вывод о наибольшей ТТХ-активности, наблюдаемой у экстрактов, выделенных в период экспоненциального роста бактерий, по отношению к глюкозе и изоцитрату в качестве субстратов. В то же время, в соответствии с приведенными в главе данными (табл. 16 и рис. 25) высокая ТТХ-активность наблюдается и при использовании малата калия. Автор не обосновывает причины, по которым малат не рассматривается в качестве субстрата.

2. Предлагаемый автором новый способ определения дегидрогеназной активности по кинетике реакции белковых экстрактов с феррицианидом калия нуждается в дополнительном обосновании целесообразности, поскольку известны водорастворимые соли тетразолия типа ХТТ, которые можно использовать как альтернативу классическому трифенилтетразолию. Также не ясно на чем основывается выбор концентраций феррицианида и раствора глюкозы в разработанном авторами методе.

3. При получении белкового экстракта после операции отделения бактериальных клеток от культуральной жидкости не предлагается операция «отмывки» бактериальных клеток. Не будет ли влияния компонентов культуральной жидкости, оставшейся в супернатанте получаемого экстракта, на электрохимические характеристики биоанода, исследуемые автором, и их воспроизводимость? Вопрос нуждается в пояснении.

4. Автор сравнивает электрокаталитическую активность биоанодов, работающих на экстрактах *E. coli*, с биоанодами, работающими на живых клетках *E. coli*. Тем не менее, отсутствует сравнение с биоанодами, работающими на ферментных каскадах, что было бы весьма показательно для оценки работы ферментного каскада в экстрактах. Кроме того, в явном виде данных, доказывающих возможность работы ферментного каскада в получаемых экстрактах, не представлено.

5. Работа не лишена некоторого количества опечаток, стилистических и иных ошибок. Например, на стр. 100 допущена опечатка в названии раздела 3.4, на стр. 77-78 при описании схем перехода ТТХ в формазан и резазурина в резорурфин пропущены электроны и т.п.

В заключение отмечу, что диссертация Дмитриевой Марии Валерьевны на тему «Электрокаталитические свойства белковых экстрактов, полученных из культуры *E. coli* ВВ» является завершённой научно-квалификационной работой, полностью соответствующей критериям пп. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации N 842 от 24 сентября 2013 г. со всеми последующими изменениями, а также соответствующей пп. 4, 10 и 11 паспорта специальности 1.4.6. Электрохимия, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.6. Электрохимия.

Оппонент

Заведующий Лабораторией биосенсоров обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

Доктор химических наук (03.00.23 -Биотехнология), профессор

Решетиллов Анатолий Николаевич

03.06.2024 г.

Адрес организации: 142290, Московская обл., г. Пушкино, пр-кт Науки, 5

Веб-сайт: www.ibpm.ru

Телефон: 8(926)5737362

E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

«Подпись Решетиллова А.Н. заверяю»

Ученый секретарь обособленного структурного подразделения
ФИЦ ПНЦБИ РАН

«Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.

Г.К. Скрыбина Российской академии

д.б.н. Т.А. Решетиллова

