

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
проблем химической физики
и медицинской химии
Российской академии наук
Д.х.н. Бадамшина Э.Р.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра проблем химической физики
и медицинской химии Российской академии наук (ФИЦ ПХФ и МХ РАН)
(142432, Московская обл., г.о. Черноголовка, г. Черноголовка, проспект Академика
Семенова, д. 1, адрес сайта: <https://www.icp.ac.ru/>)

Диссертация «Электрокаталитические свойства белковых экстрактов, полученных из культуры *E. coli* ВВ» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.6. Электрохимия выполнена в лаборатории электродных процессов в жидкостных системах отдела функциональных материалов для химических источников энергии ФИЦ ПХФ и МХ РАН.

В период подготовки диссертации соискатель Дмитриева Мария Валерьевна работала в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, в отделе функциональных материалов для химических источников энергии, лаборатории электродных процессов в жидкостных системах в должности инженера. В настоящее время работает там же в должности младшего научного сотрудника.

Соискатель Дмитриева М.В. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Астраханский государственный технический университет» в 2013 г., получив квалификацию магистра по направлению «Биотехнология».

В 2013-2017 гг. соискатель прошла обучение в очной аспирантуре ФИЦ ПХФ и МХ РАН по направлению подготовки 04.06.01 Химические науки, специальность 02.00.04 – физическая химия. Соискателем сданы кандидатские экзамены по специальностям 1.4.6. Электрохимия и 02.00.15 – Кинетика и катализ. Справка об обучении с результатами сдачи кандидатских экзаменов выдана в 2024 г. ФИЦ ПХФ и МХ РАН в качестве подтверждающего документа.

Научный руководитель:

Золотухина Екатерина Викторовна, доктор химических наук (02.00.04 – Физическая химия), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, отдел функциональных материалов для химических источников энергии, лаборатория электродных процессов в жидкостных системах, главный научный сотрудник.

По итогам обсуждения диссертации «Электрокаталитические свойства белковых экстрактов, полученных из культуры *E. coli* ВВ» на заседании секции № 6 Ученого совета ФИЦ ПХФ и МХ РАН принято следующее заключение:

Работа Дмитриевой М.В. посвящена анализу биоэлектрокаталитических свойств нового типа биокатализаторов – ферментативных экстрактов *E. coli* ВВ в процессах окисления различных субстратов, что представляет теоретический и практический интерес в области разработки биотопливных элементов.

Актуальность темы

Биоэлектрокатализ – явление, которое лежит в основе работы современных биосенсоров для контроля физиологически важных органических веществ и активно развиваемых биотопливных элементов. Процессы окисления субстрата (топлива) или восстановления окислителя, протекающие в таких устройствах, происходят при участии биологических объектов – ферментов или живых микроорганизмов. Интерес к биологическим катализаторам обусловлен, прежде всего, не только большой скоростью реакций с их участием, но и высокой селективностью таких катализаторов. Кроме того, биокатализаторы представляют собой воспроизводимый ресурс. Основной проблемой использования чистых ферментов для осуществления биоэлектрокатализа является очень продолжительная и сложная процедура их выделения и очистки. Это существенно ограничивает их практическое применение, кроме сенсорных приложений. 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 биоэлектродокатализаторов, до сих пор не описанный в литературе: грубые белковые экстракты, полученные разрушением клеток модельной культуры *Escherichia coli* ВВ без дальнейшего разделения и очистки, что привлекательно для практического использования. Такие системы являются аналогом ферментативного каскада и отличаются простотой получения. В связи с этим цель, поставленная в работе М.В. Дмитриевой, - определение закономерностей медиаторного биоэлектродокатализа экстрактами *E. coli* ВВ в процессах окисления субстратов (глюкоза, цитрат), - является актуальной.

Новизна и практическая значимость результатов работы

Автором впервые предложен новый тип биоэлектродокатализаторов для окисления различных субстратов (глюкоза, цитрат калия) – грубые белковые экстракты, получаемые ультразвуковой дезинтеграцией клеток микроорганизмов. Применимость данного способа продемонстрирована в отношении белковых экстрактов, полученных из разных классов микроорганизмов: *Escherichia coli* и *Saccaromyces cerevisiae*. Доказана дегидрогеназная активность получаемых экстрактов на основе *E.coli* на разных стадиях роста культуры к различным субстратам, а также их электрохимическая активность в составе медиаторного биоанода. Найдены оптимальные условия, при которых экстракты проявляют максимальную дегидрогеназную и электрохимическую активности. Впервые показано, что состав и природа буферной системы являются одним из ключевых факторов, определяющих активность ферментов в составе экстракта. Определена лимитирующая стадия кинетики медиаторного биоэлектродокатализа с используемыми экстрактами в составе биоанодов.

Предложен новый способ оценки дегидрогеназной активности спектроскопическим методом по кинетике восстановления феррицианида калия в контакте с белковым экстрактом, позволяющий сократить время эксперимента.

Предложена новая конструкция асимметричного биотопливного элемента с биоанодом и разделенными пространствами, позволяющая произвольно и независимо изменять состав биоанода, что позволяет изучать влияние различных факторов на вольтамперные характеристики биотопливного элемента.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных в работе результатов обеспечивается использованием комплекса современных биохимических, физических и электрохимических методов исследования, воспроизводимостью экспериментальных данных, согласованностью и непротиворечивостью результатов, а также непротиворечивостью полученных в работе результатов с данными, известными из научной литературы.

Результаты работы подвергались многократной независимой положительной экспертизе и опубликованы преимущественно в ведущих рецензируемых изданиях, индексируемых в Scopus, Web of Science, RSCI, относящихся к журналам K1 и K2 в классификации ВАК Минобрнауки РФ. Основные результаты диссертации неоднократно обсуждались на российских и международных конференциях: X и 14-я конференция «Физико-химические проблемы возобновляемой энергетики» (г. Черноголовка, 2014, 2018 гг.); Российская конференция «Физико-химические проблемы возобновляемой энергетики» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.); 28 симпозиум «Современная химическая физика» (г. Туапсе, 2016 г.); 13, 14, 15 и 16 Международное совещание "Фундаментальные проблемы ионики твердого тела", ФПИТТ (г. Черноголовка, 2016, 2018, 2020, 2022 гг.); International conference "Ion Transport in Organic and Inorganic Membranes" (Сочи, 2017 г.); XI International Conference «Mechanisms of Catalytic Reactions», MCR (г. Сочи, 2019 г.); Международная научно-техническая конференция «Современные электрохимические технологии и оборудование» (г. Минск, 2019 г.); XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», секция «Химия» (г. Москва, 2019 г.); 62 и 64 Всероссийская научная конференция МФТИ (г. Долгопрудный, 2019, 2021 гг.); 5-я Международная научная конференция перспективных разработок молодых ученых «Наука молодых - будущее России» (г. Курск, 2020 г.); Международная научная конференция «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration» (г. Пекин, 2020 г.); VI Международная научно-практическая конференция "Актуальные проблемы науки и техники" (г. Уфа, 2021 г.); VII Международная научно-практическая конференция "Технологические инновации и научные открытия" (г. Уфа, 2021 г.); XIII Международная научно-практическая конференция "Инновационный потенциал развития мировой науки и техники: взгляд современных ученых" (г. Нижний Новгород, 2023 г.).

Плановый характер работы

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

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

Полнота опубликования результатов и ценность научных работ соискателя ученой степени

Всего по материалам диссертации соискателем совместно с соавторами опубликовано 7 статей в журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ для защиты диссертаций на соискание ученой степени кандидата химических наук, и 21 тезис докладов на конференциях разного уровня, 1 патент.

Статьи по результатам работы:

1. **Dmitrieva, M.V.** Dehydrogenase and electrochemical activity of *Escherichia coli* extracts / M.V. Dmitrieva, E. V. Zolotukhina, E. V. Gerasimova, A. A. Terent'ev, Yu. A. Dobrovolskii. – DOI 10.1134/S0003683817040032 // *Appl Biochem Microbiol.* – 2017. – V. 53, № 4. – 458-463.
2. **Dmitrieva, M.V.** Electrochemical Peculiarities of Mediator-Assisted Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose by a New Type of Bioelectrocatalyst / M. V. Dmitrieva, E. V. Gerasimova, A. A. Terent'ev, Yu. A. Dobrovolskii, E. V. Zolotukhina. – DOI 10.1134/S1023193519090064 // *Russian Journal of Electrochemistry.* - 2019. V. 55, № 9. – 1111-1123.
3. **Dmitrieva, M.V.** Data describing the cofactor additives effect on bioelectrocatalytic activity of «crude» extracts / M.V. Dmitrieva, E. V. Zolotukhina. – DOI 10.1016/j.dib.2020.105513 // *Data Brief.* 2020. - V. 30. – 105513.
4. **Dmitrieva, M.V.** Kinetics of Mediated Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose by Protein Extracts of *Escherichia coli* / M.V. Dmitrieva, I. N. Shishov, S. V. Shmalii, V. D. Myazin, A. Yu. Bazhenov, E. V. Gerasimova, E. V. Zolotukhina. – DOI 10.1134/S1023193520110038 // *Russian Journal of Electrochemistry.* 2020. - V. 56, № 11. – 1034-1041.
5. **Dmitrieva, M. V.** Peculiarities of Using Potassium Ferricyanide as the Mediator for Bioanodes Based on *Escherichia coli* / M.V. Dmitrieva, A. S. Freiman, V. V. Sorokin, A. A. Terent'ev, E. V. Zolotukhina. DOI 10.1134/S1023193522100044 // *Russian Journal of Electrochemistry.* 2022. - V. 58, № 10. - 885–890.
6. **Дмитриева, М.В.** Влияние pH и состава питательной среды на дегидрогеназную активность экстрактов, полученных из *Escherichia coli* / М.В. Дмитриева, В.Д. Мязин, Е.В. Золотухина. DOI 10.18522/1026-2237-2023-3-140-146 // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки.* 2023. - № 3. – 140-146.
7. **Дмитриева, М.В.** Разработка технологии получения нового биоэлектродокатализатора – «грубого» экстракта *Saccharomyces cerevisiae* / М.В. Дмитриева, В. А. Павлов, П. С.

Афанасьева, Е. В. Золотухина. DOI 10.18522/1026-2237-2024-1-133-140 // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2024. - № 1. – 133-140.

Патент:

Патент № 2762009С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/00 (2006.01). Способ оценки дегидрогеназной активности белковых экстрактов, полученных из микроорганизмов: № 2020137971: заявл. 19.11.2020: опубл. 14.12.2021 / Дмитриева М.В., Золотухина Е.В., Фрейман А.С., Сорокин В.В.; заявитель ФГБУН ИПХФ РАН.

Все статьи, выполненные в соавторстве, процитированы в диссертации в соответствии с п. 14 критериев Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.04.2013 г., с учетом всех последующих изменений. Результаты, описанные в диссертации, являются оригинальными, заимствованные материалы без ссылки на источник заимствования отсутствуют.

В опубликованных материалах довольно полно изложены основные результаты работы. В работах [1,6] описывается метод ультразвуковой дезинтеграции для получения грубых белковых экстрактов, а также содержатся результаты, показывающие, что природа, ионная сила и рН буферного раствора, применяемого на стадии ресуспендирования при получении грубых экстрактов, оказывают непосредственное влияние на экстракцию белка, дегидрогеназную и электрохимическую активности, данные результаты включены в третью главу диссертации (разделы 3.1 и 3.2). В работе [7] показана применимость разработанного подхода к получению аналогичных биоэлектрокатализаторов из принципиально иного класса микроорганизмов, *Saccaromyces cerevisiae*. (раздел 3.4). Работа [2] содержит результаты, показывающие медиаторный характер сопряжения биохимической и электрохимической реакций в исследуемой системе и значение выбора редокс-медиаторной системы, а также данные о влиянии типа буферного раствора, его концентрации и рН на каталитическую активность исследуемого биоэлектрокатализатора, эти результаты показаны в четвертой главе диссертации (разделы 4.1, 4.2 и 4.4). Работа [3] содержит результаты, описывающие электрохимическую активность белкового экстракта после различных стадий очистки, результаты данного исследования приведены в четвертой главе диссертации (раздел 4.7). В работе [4] описаны особенности кинетики медиаторного биоэлектрокаталитического окисления глюкозы исследуемыми экстрактами (глава 4, раздел 4.6) и приведено описание конструкции разработанного модельного ассиметричного биотопливного элементе (глава 2, раздел 2.8) и его тестовых испытаний (глава 4, раздел 4.10). В работе [5] показаны результаты пробного испытания биоэлектрохимической активности живых клеток *E. coli*,

приведенные в четвертой главе диссертации (глава 4, раздел 4.9). Патент защищает способ оценки дегидрогеназной активности получаемых экстрактов по кинетике редокс-перехода феррицианида калия, описанный в главах 2 и 3 диссертации.

Ценность научных работ соискателя для электрохимии обусловлена развитыми в работе представлениями о закономерностях осуществления медиаторной биоэлектродокаталитической реакции окисления глюкозы ферментативными экстрактами и выявлении ключевых параметров, влияющих на кинетику этой реакции.

Предложен новый объект для осуществления биоэлектродокаталитического окисления субстратов (топлив) - грубые белковые экстракты, который демонстрирует аналогичные чистым ферментам электрохимические и каталитические характеристики. Разработана новая конструкция двухэлектродного биотопливного элемента с разделенными пространствами, позволяющая произвольно и независимо изменять состав биоанода, что является важным вкладом в биоэлектрохимию.

Личный вклад автора

Постановка задач и выбор методов исследования, а также интерпретация результатов и их опубликование в научных журналах выполнены автором совместно с научным руководителем. Поиск и анализ научно-технической литературы, выполнение основных экспериментальных работ, обработка полученных данных, формулировка выводов сделаны лично соискателем.

Публикации по материалам, изложенным в диссертации, выполнены в соавторстве. В работах [1-7] и патентах соискателем выполнены биохимические и электрохимические измерения, обработка результатов, написание первичных версий, редактирование переработанных версий.

Соответствие диссертации научным специальностям, отрасли науки

Диссертация Дмитриевой М.В. на тему: «Электрокаталитические свойства белковых экстрактов, полученных из культуры *E. coli* ВВ» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена задача по установлению закономерностей осуществления медиаторной биоэлектродокаталитической реакции окисления глюкозы ферментативными экстрактами и выявлению ключевых параметров, влияющих на кинетику этой реакции.

Работа соответствует паспорту специальности 1.4.6. Электрохимия, химические науки, в п. 4 (Динамика процессов на межфазных границах (кинетики элементарных стадий электродных процессов, кинетика адсорбционных и хемосорбционных процессов, теория переноса электрона и ионов через границу раздела фаз, электрохимическая интеркаляция). Электрокатализ. Электрохимические процессы на пористых электродах,

макрокинетика электродных процессов. Трехмерные проточные электроды.), п. 10 (Электрохимическая генерация, передача и хранение энергии; оптимизация электролитов, электродных материалов, сепараторов и мембран. Теория, исследование и моделирование химических источников тока (первичных элементов, аккумуляторов, топливных элементов, суперконденсаторов, проточных редокс-батарей). Устройства для преобразования и временного запасаания электрической энергии.) и п. 11 (Редокс-процессы с участием компонентов биологических систем; электрохимия биомембран и их моделей; электрохимические биосенсоры; приложения электрохимических методов в биологии и медицине).

Решение о рекомендации работы к защите

Диссертация Дмитриевой Марии Валерьевны «Электрокаталитические свойства белковых экстрактов, полученных из культуры *E. coli* ВВ» соответствует всем критериям Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.04.2013 г., с учетом всех последующих изменений, применительно к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.6. Электрохимия (химические науки).

Заключение принято на заседании секции № 6 Ученого совета ФИЦ ПХФ и МХ РАН (протокол № 3 от 25 марта 2024 года). Присутствовали на заседании 21 член совета из 21. Результаты голосования: «за» – 21, «против» – нет, «воздержались» – нет.

Председатель секции № 6
Ученого совета ФИЦ ПХФ и МХ РАН
кандидат химических наук



Н.В. Лысков

Секретарь секции № 6
Ученого совета ФИЦ ПХФ и МХ РАН
кандидат химических наук



С.П. Шилкин