



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

410049, г.Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13. Тел.: (845-2) 97-04-44, 97-04-03.

Факс: (845-2) 97-04-44, 97-03-83.

E-mail: institute@ibppm.sgu.ru, http://ibppm.ru

ОКПО 04740828, ОГРН 1026402489013, ИНН/КПП 6451105279/645101001

№ 12322-04-13-623 от 18.12.2017г.

на _____ от _____



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБФРМ РАН

д-р хим. наук, профессор

С.Ю. Щеголев

18 » декабря 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Тарасова Сергея Евгеньевича «Свойства биосенсоров и микробных топливных элементов при исследовании методом импедансной спектроскопии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа Тарасова Сергея Евгеньевича посвящена изучению свойств систем на основе микробных клеток и их фрагментов при их использовании в составе биосенсоров и биотопливных элементов методом электрохимической импедансной спектроскопии. Метод электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС) применяется в качестве информативного рабочего инструмента при анализе гетерогенных систем в физике, электрохимии и материаловедении. Биологические объекты зачастую можно рассматривать именно как гетерогенные системы, близкие по свойствам к эмульсиям или суспензиям. Поэтому в последние 10 лет метод ЭИС начал привлекать внимание биологов и использоваться при изучении живых организмов. Применение импедансометрических преобразователей в биосенсорах может помочь расширить диапазоны определяемых концентраций для исследуемых веществ, повысить селективность устройств, увеличить срок службы биоматериала в биосенсорах и преодолеть другие существующие недостатки электрохимических биосенсоров. В связи с этим актуальность исследований не вызывает сомнений.

100852

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей разделы материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 32 таблицы и 54 рисунка. Библиографический указатель включает 251 источник литературы.

Во введении автор аргументирует актуальность проблемы и обосновывает необходимость проведения данного исследования, а также описывает возможности применения результатов работы в микробиологии и биотехнологии. Цель работы чётко сформулирована, задачи соответствуют поставленной цели.

Обзор литературы состоит из одной главы, разделенной на 2 подглавы.

В первой подглаве представлен анализ научной литературы по электрохимическим устройствам на основе биоматериалов. Данная глава разделена на 5 разделов, в которых дается исчерпывающая информация о биосенсорах и их классификация; о биотопливных элементах и их преимуществах; об использовании целых клеток микроорганизмов в биотопливных элементах и биосенсорах; об использовании наноматериалов в биотопливных элементах; о методах изучения биотопливных элементов.

Вторая подглава посвящена описанию электрохимической импедансной спектроскопии. Подглава разделена на 5 разделов, в которых автором достаточно полно и детально перечислены теоретические основы импедансной спектроскопии и варианты её применения для изучения биологических объектов и электрохимических систем на их основе. К достоинствам обзора литературы можно отнести то, что он носит не только описательный, но и аналитический характер.

В главе 2, материалы и методы, подробно описаны методы и методики, используемые автором в своей работе, они адекватны поставленным задачам и не вызывают возражений.

Положительной оценки заслуживает изложение достаточно сложного материала в главе 3, посвященной результатам и их обсуждению.

В подглаве 3.1 подробно описано создание импедансометрических биосенсоров, рассматриваются параметры созданных микробных и ферментных биосенсоров с импедансометрическим преобразователем. Данные биосенсоры могут использоваться как альтернатива существующим электрохимическим биосенсорам для определения глюкозы и спиртов. Описанные в диссертационной работе биосенсоры отличаются достаточно широким линейным диапазоном определяемых концентраций. К преимуществам разработанных сенсоров по сравнению

с биосенсором на основе берлинской лазури можно отнести легкость пробоподготовки электрода – время подготовки одного электрода без берлинской лазури составляло 1 ч против 6 ч у амперометрического биосенсора. Использование метода ЭИС позволило снизить рабочий потенциал, прикладываемый к системе, по сравнению с амперометрическими аналогами.

В разделе 3.2 описана разработка биосенсора на основе алкогольоксидазы. В работе в качестве основы биосенсора для определения содержания этанола автор использовал алкогольоксидазу, выделенную из гриба *Pichia pastoris*. Конфигурация биосенсора повторяла модель биосенсора на основе глюкозооксидазы, но фермент глюкозооксидаза (ГО) был заменен на алкогольоксидазу (АО). Особенностью АО является то, что данный фермент не способен отдавать электроны любому другому акцептору, кроме кислорода. Поэтому автором была использована технология «биферментного электрода» с добавлением на поверхность биосенсора пероксидазы хрена (ПХ). Проведенные автором исследования позволили ему сделать вывод, что разработанные биосенсоры с импедансометрическим преобразователем на основе алкогольоксидазы и пероксидазы хрена могут рассматриваться в качестве альтернативы для амперометрических АО-биосенсоров, превосходя их по долговременной стабильности и по верхнему пределу обнаружения.

В разделе 3.3 приводятся результаты по созданию микробных биосенсоров на основе бактерий *Gluconobacter oxydans*. Поскольку большинство ферментов, применяемых в биосенсорах, выделяют из микроорганизмов, как потенциальные биокатализаторы для импедансометрических биосенсоров были рассмотрены и целые клетки бактерий. Разработанный микробный импедансометрический биосенсор на основе *G. oxydans* может быть использован для определения глюкозы и этанола. Предложенный микробный биосенсор при определении этанола превосходит конкурентов по всем параметрам. При этом он отличается более высокой стабильностью, что может быть связано с большей устойчивостью ферментов внутри живых бактериальных клеток, чем при иммобилизации их на поверхности электрода в очищенном виде. Автором показано, что клетки уксуснокислых бактерий *G. oxydans* могут быть использованы в качестве биокатализатора в импедансометрических биосенсорах наравне с ферментами, в тех областях промышленности, где низкая селективность данных биосенсоров не станет препятствием для их использования.

Следующий раздел посвящен применению метода ЭИС при разработке микробных биотопливных элементов (БТЭ). Приводятся результаты исследований модификации биоанода БТЭ углеродными наноматериалами для повышения мощности БТЭ. Проведена

сравнительная оценка мощностных, вольтамперных и импедансных характеристик БТЭ при иммобилизации клеток бактерий *G. oxydans* в гели таких полимеров, как хитозан, поливиниловый спирт и поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном). Кроме того, автором изучена возможность использования мембранных фракций бактерий в качестве биокатализатора БТЭ, и сделан вывод, что БТЭ на основе мембранных фракций не превосходят по мощности ферментные аналоги, однако являются более дешевыми и надежными в эксплуатации. Автором проведены исследования по изучению возможности использования в качестве биоэлектродов БТЭ, альтернативных традиционным материалам, например, углеродных высокодисперсных материалов (УВМ). В работе изучены 3 типа УВМ, различающиеся степенью карбонизации.

В диссертации показано, что метод ЭИС может быть применен для характеристики процессов, происходящих в живых клетках. В результате проведенных исследований продемонстрировано, что метод ЭИС позволяет регистрировать изменение количества клеток в исследуемом образце по изменению общего импеданса системы. В случае грамотрицательных бактерий возможна регистрация бактериологического лизиса клеток в реальном времени по уменьшению емкости двойного электрического слоя клеток. На примере дрожжей показано, что методом ЭИС можно регистрировать изменения проводимости раствора в суспензии клеток и оценивать влияние различных агентов на структуру клеток по выходу общего количества ионов во внешнюю среду.

В последнем разделе автором приводятся результаты по практическому применению микробных БТЭ с помощью конвертерного накопления электроэнергии от микробных БТЭ и генерации электроэнергии микробным БТЭ от эндогенной глюкозы травяной лягушки. В работе впервые показана генерация электроэнергии имплантируемым микробным БТЭ при его питании эндогенной глюкозой в организме земноводного, и впервые для изучения характеристик имплантированного БТЭ применен метод ЭИС. Полученные данные расширяют представления о возможности дальнейшего совершенствования устройств, используемых для генерации электроэнергии *in vivo*.

Выводы, сформулированные автором, адекватны поставленным задачам и основаны на результатах проведенной экспериментальной работы.

Цели и задачи, поставленные в диссертации, выполнены полностью.

Научная новизна работы основана на том, что автором:

- Разработаны ферментные и микробные импедансометрические биосенсоры для определения глюкозы и этанола на базе печатных графитовых электродов.

- Впервые для штамма бактерий *Gluconobacter* проведено исследование влияния свойств нанокompозита «углеродный материал – бактерии – наноматериал – гель-матрица» на электрохимические свойства биоанодов микробного БТЭ.

- Выполнена оценка эффективности применения метода импедансной спектроскопии для описания процессов разрушения клеток под действием лизирующего препарата лизоамидазы и электропорации клеточных мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

- Впервые для микробного БТЭ, модифицированного углеродными нанотрубками, показано значительное увеличение эффективности работы конвертерного преобразователя напряжения. Впервые описан способ получения электроэнергии с помощью микробного БТЭ, основанного на электродах из наноматериала, имплантированного в организм живого земноводного (травяной лягушки *Rana temporaria*) за счет окисления эндогенного субстрата (глюкозы).

Практическая значимость диссертационной работы обусловлена тем, что:

- Предложены новые варианты импедансометрических биосенсоров на основе ферментов и целых микробных клеток для определения глюкозы и этанола. Биосенсоры созданы на коммерчески доступных печатных графитовых электродах и могут служить для экологического мониторинга, пищевой промышленности или клинических исследований.

- Разработана методика введения наноматериалов в полимерные гели на поверхности биоэлектрода, что позволило увеличить мощность микробных БТЭ на 40% при использовании функционализированных углеродных нанотрубок и оксида графена по сравнению с элементами, использующими стандартные графитовые электроды. Исследование свойств углеродных высокодисперсных материалов на основе полиакрилонитрила показало возможность использования данного класса материалов с управляемыми параметрами для создания электродов для микробных биосенсоров и БТЭ и эффективность создания механически гибких электродов.

- Разработана модельная система для оценки конвертерного накопления электроэнергии от микробных топливных элементов, которая может быть применена в практическом внедрении технологий повышения напряжений постоянного тока от устройств малой мощности типа БТЭ. Работа по встраиванию микробного БТЭ в организм травяной лягушки может быть использована как база для дальнейших исследований имплантируемых БТЭ, топливом для которых служат эндогенные субстраты.

- Получен патент РФ на изобретение RU2599421 «Способ получения электрической энергии с помощью микробного биотопливного элемента, имплантированного в организм живой травяной лягушки *Rana Temporaria*».

Востребованность и актуальность решаемой проблемы не вызывает сомнений, поскольку по результатам исследований уже получен Патент РФ, а апробация материалов прошла на крупных научных форумах.

По материалам диссертационной работы было опубликовано 25 печатных научных работ, в том числе 6 статей опубликованы в научных изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, а также получен 1 патент РФ.

Современный методический уровень исследований, широкий диапазон исследуемых материалов, логическая последовательность и четкость изложения материала свидетельствует о достоверности полученных автором результатов. Несомненным достоинством диссертации является хороший литературный научный стиль изложения, качественно выполненный иллюстративный материал.

Содержание автореферата полностью отражает содержание диссертационной работы.

Несмотря на безусловную положительную оценку диссертации, необходимо отметить ряд замечаний:

- в списке литературы отсутствует работа (Yoo and Lee, 2010), имеется работа Yoo E.H., Lee S.Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. // Sensors – 2011. – V.10. – №5. – P. 4558 – 4576;
- в литературном обзоре не приводятся данные о работах доктора M. Mascini, который занимался разработкой биосенсоров, в том числе с графитными и золотыми электродами, и их применением. Данные исследования украсили бы литературный обзор и позволили бы автору сравнить разработанные им датчики с уже используемыми на практике;
- низкая стоимость микробных биосенсоров, разработка и описание которых приводится в разделе 3.1, ничем не подтверждена. В работе нет экономических расчетов и сравнений, четко свидетельствующих о данном высказывании. Аналогичное замечание относится к заключению, что «БТЭ на основе мембранных фракций не превосходят по мощности ферментные аналоги, однако являются более дешевыми и надежными в эксплуатации»;
- к сожалению, в работе нет данных о времени сохранения активности иммобилизованных клеток;
- в качестве иммобилизующих агентов автором были выбраны хитозан, поливиниловый спирт и поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном. В работе не обоснован выбор этих агентов. Почему не был использован гель агар-агара в качестве иммобилизующего агента, который безопасен для микробных клеток;
- при исследовании воздействия добавления лизоамидазы на микробные клетки с помощью разработанных датчиков приводятся исследования по уменьшению сопротивления электролита и т.д., но нет данных об изменении количества жизнеспособных клеток, полученных стандартными микробиологическими методами;

- в работе присутствуют стилистические ошибки и опечатки.

Однако, указанные замечания не затрагивают научную ценность и новизну основных результатов диссертации и ни в коей мере не снижают общей высокой и, безусловно, положительной оценки работы, т.к. задачи, поставленные в работе, полностью и успешно выполнены.

Таким образом, можно заключить, что по своей актуальности, методическому уровню, объему и достоверности полученных результатов, их новизне, теоретической и научно-практической значимости работа Тарасова Сергея Евгеньевича «Свойства биосенсоров и микробных топливных элементов при исследовании методом импедансной спектроскопии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) полностью соответствует всем п. 9 Положения о присуждении ученых степеней (Постановление Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Тарасов Сергей Евгеньевич достоин присуждения искомой степени по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв обсужден и утвержден на расширенном заседании лаборатории иммунохимии с участием сотрудников лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, протокол №56 от 14 декабря 2017 г.

Ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии,
д.б.н., старший научный сотрудник



Л.А. Дыкман

Подпись ведущего научного сотрудника лаборатории
иммунохимии д.б.н., Л.А. Дыкмана заверяю

Ученый секретарь ИБФРМ РАН

к.б.н.



О.Г. Селиванова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Российской Федерации
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук

410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13.

Тел.; +7(8452)970444, Факс: +7(8452)970383

E-mail.: dykman1962@mail.ru