

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Андреева Егора Андреевича «Электрохимический сенсор на основе поли(3-аминофенилборной кислоты) для обнаружения микроорганизмов», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология.

Диссертация Андреева Е.А. посвящена актуальной проблеме – разработке сенсоров для распознавания и измерения концентраций биоактивных молекул и микроорганизмов (в том числе болезнетворных) в жидких средах и аэрозолях. С целью увеличения операционной стабильности, быстродействия и селективности сенсоров автором предложено использовать полимерные сенсорные материалы, содержащие функциональные группы, способные к специфическим взаимодействиям с 1,2- и 1,3-*цис*-диольными фрагментами моносахаридов и гидроксикислот. Применение этих сенсорных материалов открывает перспективы решения таких медицинских и биотехнологических задач, как контроль природных моносахаридов и их производных при различных болезнях (гликозурия, муковисцидоз, рак и др.), энантиомерная чистота синтетических лекарств, мониторинг процессов ферментации и пр.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследований, представлена научная новизна, показана теоретическая и практическая значимость работы, приведены методы и методология исследования, достоверность и апробация результатов, личный вклад автора, положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, в котором рассмотрено применение борных кислот в качестве синтетических рецепторов для задач биомиметики. Приведены физико-химические основы взаимодействия фенилборных кислот с 1,2- или 1,3-*цис*-диолами. Указаны преимущества использования полимеров с функциональными фрагментами борных кислот для создания сенсорных материалов.

Глава 2 посвящена обзору структурных превращений в проводящем полианилине, происходящих при его электрохимическом синтезе и допировании/дедопировании применительно к перспективе использования данного полимера в сенсорах. Также рассмотрен боронат-замещенный полианилин, указаны перспективы его применения в данной области.

В **Главе 3** обоснованы преимущества использования спектроскопии электрохимического импеданса для регистрации электрохимического отклика сенсоров на основе проводящих полимеров. Приведены основные элементы эквивалентных схем, используемых для описания физико-химических процессов в исследуемых системах.

Глава 4 посвящена обзору методов обнаружения микроорганизмов. Выявлены основные чувствительные элементы для иммобилизации микроорганизмов на сенсорных электродах: заряженные поверхности, биораспознающие элементы, синтетические рецепторы. Выявлены недостатки существующих методов, такие как необходимость использования дополнительных реагентов и пробоподготовки, невозможность определения в воздухе. Сделан вывод об актуальности поиска новых методов обнаружения микроорганизмов в водной и воздушной среде.

В **экспериментальной части** перечислены материалы, электроды, методы и оборудование, используемые для нанесения и исследования физико-химических, морфологических и сенсорных характеристик слоев на основе полианилина и поли(3-аминофенилборной кислоты (3-АФБК)). Приведены микробиологические методики посева образцов, содержащих микроорганизмы, подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ), получения их суспензий и аэрозоля.

Глава 6 посвящена электрохимическому осаждению проводящих полимеров на основе анилина и 3-АФБК и сравнительному исследованию их электрохимических свойств при различных рН водной среды. Включение остатков борной кислоты в цепь проводящего полимера позволяет создать безреагентный сенсорный материал, способный специфически взаимодействовать с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами – структурными компонентами гидроксикислот, моносахаридов, а также олиго- и полисахаридов в составе клеточных стенок микроорганизмов.

Проведены эксперименты по оптимизации методики синтеза поли(3-АФБК) на стеклоуглеродных торцевых электродах в потенциодинамическом и гальваностатическом режиме. Убедительно показано, что, помимо придания сенсорных свойств по отношению к веществам с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами, введение борно-кислотного фрагмента в структуру полианилина приводит к расширению рН-диапазона электроактивности полимера вплоть до слабощелочных сред. Этот результат важен с практической точки зрения, так как позволяет применять разрабатываемый сенсорный материал в средах с «биологическими» значениями рН.

Далее приведена методика модификации взаимопроникающих микроэлектродов поли(3-АФБК), двухэлектродная схема подключения которых значительно упрощает дальнейшую работу с реальным сенсорным устройством. Электрохимическими и микроскопическими исследованиями наглядно показано образование полимера поли(3-АФБК) в межэлектродном пространстве, что в дальнейшем позволит сенсору функционировать по двухэлектродной схеме, в том числе и в потоке аэрозоля.

Глава 7 посвящена исследованию взаимодействия различных соединений, содержащих 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты, с поли(3-АФБК), что сопровождается изменением сопротивления полимера. Для регистрации этих изменений применен один из наиболее информативных, чувствительных и малодеструктивных методов - спектроскопия электрохимического импеданса. Убедительно показано, что изменение проводимости синтезированного полимера в контакте с растворами глюкозы при рН 7.0 действительно обусловлено специфическим связыванием борнокислой группы с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами. Также показано, что отклик сенсора на основе поли(3-АФБК) на присутствие глюкозы в растворе полностью обратим и специфичен (на основании контрольных экспериментов с ацетатом натрия), в отличие от известных кондукто- и импедиметрических сенсорных систем на основе мономерной фенилборной кислоты.

На основании измерений проводимости предложен метод оценки наблюдаемых констант связывания поли(3-АФБК) с различными соединениями, содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты (глюкоза, галактоза, сорбитол, лактат калия) и уточнен выбор оптимальных параметров синтеза поли(3-АФБК) с целью достижения максимальных значений констант связывания. Убедительно показано, что режим циклирования потенциала является предпочтительным для создания сенсора. Построены градуировочные кривые и определены интервалы концентраций для определения каждого из вышеуказанных соединений, продемонстрировано влияние рН среды на константы связывания. Эти результаты можно использовать для дополнительной дискриминации сенсорного отклика при совместном присутствии определяемых веществ.

Глава 8 посвящена применению сенсоров на основе поли(3-АФБК) для обнаружения микроорганизмов (на примере *Penicillium chrysogenum*) в водной среде и аэрозоле. Наряду с торцевыми стеклоуглеродными электродами были использованы взаимопроникающие золотые микроэлектроды, которые обеспечивают миниатюризацию сенсора для облегчения его использования в аналитической практике за пределами лабораторных помещений. Перед

экспериментами с микроорганизмами взаимопроникающие микроэлектроды, модифицированные поли(3-АФБК), были протестированы на сенсорные свойства по отношению к глюкозе в жидкой среде и аэрозоле и показали отличные результаты.

Для исследования возможности обнаружения микроорганизмов в жидкой среде авторы применяли водные суспензии спор плесневых грибов *Penicillium chrysogenum*, клеточная стенка которых более чем на 60% состоит из олиго- и полисахаридов, содержащих 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты. Градуировочные кривые были построены на основании измерений спектров электрохимического импеданса в присутствии суспензий плесневых грибов с известными концентрациями, определенными методом посева, что потребовало от автора значительной биотехнологической подготовки. В результате было убедительно показано, что изменение сопротивления пленок поли(3-АФБК) с успехом может быть использовано для определения концентрации микроорганизмов в водной среде.

Также большим достижением автора следует считать эксперимент по определению содержания микроорганизмов в аэрозоле, который показал высокую эффективность использования поли(3-АФБК) в качестве сенсорного материала в воздушной среде.

Основные результаты диссертации опубликованы в трех статьях в российских и международных реферируемых журналах, включенных в список ВАК, и неоднократно доложены на российских и международных конференциях, что свидетельствует о всесторонней апробации данной работы.

Содержание диссертации соответствует специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе, бионанотехнологии), автореферат диссертации и опубликованные по ней статьи адекватно отражают ее содержание.

По диссертации следует сделать следующие замечания:

1. Стр. 58, 67 и 70, Рис. 25, 32 и 37. Почему катодные пределы циклирования потенциала разные? Этот параметр особенно важен при синтезе в режиме циклирования потенциала (Рис. 25), поскольку может влиять на морфологию образующейся пленки.
2. Стр. 86. Различия в значениях константы связывания глюкозы с полимером для пленок, полученных в условиях циклирования потенциала и гальваностатических, может быть связано с различной морфологией пленок: в условиях циклирования пленки аналогичных полимеров (полианилин) получают более рыхлыми, с более развитой поверхностью. При этом, с

учетом замечания 1, расширение катодного предела циклирования до $-0,2$ В (что соответствовало бы завершению процесса восстановления пленки) могло бы привести к формированию еще более развитой поверхности и, соответственно, повышению чувствительности сенсора.

3. Стр. 101. При выводе о повышенной чувствительности сенсора на щелевых электродах к суспензии спор микроорганизмов следовало бы рассмотреть возможность того, что присутствие частиц спор в зазоре может увеличивать проводимость. Для доказательства «чистоты» эффекта следовало бы провести опыт с химически инертной суспензией.

Сделанные замечания носят, в основном, рекомендательный характер и не снижают высокой оценки данной работы. Диссертация Андреева Е.А. соответствует требованиям ВАК к кандидатской диссертации, в частности, требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, так как в ней решена научная задача разработки и оптимизации работы электрохимического сенсора на основе поли(3-аминофенилборной кислоты) для обнаружения микроорганизмов. Таким образом, автор диссертации заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе, бионанотехнологии).

Официальный оппонент,

Некрасов Александр Александрович

Доктор химических наук,

Заведующий лабораторией «Электронные и фотонные процессы в полимерных наноматериалах» ФГБУН Института физической

химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,

119071, Москва, Ленинский пр., 31, корп. 4

Тел: +7(495)9554017; e-mail: secp@elchem.ac.ru

02 мая 2017 г.

Подпись А.А. Некрасова заверяю

Ученый секретарь ИФХЭ РАН



И.Г. Варшавская