

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Ходикіної Марії Олегівни** “**Формування гетероструктур в системі неорганічний носій – нативний ферментний препарат класу оксидоредуктаз**”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 – фізична хімія

Дисертаційна робота М. О. Ходикіної є продовженням напряму наукових досліджень Інституту загальної та неорганічної хімії ім. В. І. Вернадського НАН України, присвяченого дослідженню нових матеріалів для хімічних джерел електричної енергії, сенсорів тощо в ракурсі зеленої хімії. З огляду на це, перспективним є використання ензимів – природних сполук з ефективністю (каталітичною активністю) яких досі не може зрівнятися жоден інший тип каталізаторів. Водночас у пристроях різного призначення ензими часто мають бути нанесені на провідні підкладки, які, до того ж, мали б забезпечувати нативність таких препаратів протягом тривалого часу. Вибір підкладок/медіаторів на сьогодні обмежується практично лише електропровідними полімерами, тоді як мінеральні високодисперсні носії для таких цілей практично не використовують. Тому не викликає сумніву, що наукові дослідження у вибраному здобувачем напрямі є **актуальними** як в теоретичному, так і практичному аспектах.

Актуальність дисертаційної роботи М. О. Ходикіної підтверджується також тим, що вона протягом 2012–2017 рр. виконувалася в Інституті загальної та неорганічної хімії ім. В. І. Вернадського НАН України в рамках двох держбюджетних тем, а саме «Розробка електрохімічних систем з малою перенапругою катодних та анодних процесів та високоекономічних електролізерів для одержання водню високої чистоти» та «Синтез і фізико-хімічні властивості неорганічних електрокаталізаторних систем на основі карбїду вольфраму, модифікованого металами Ib (Cu, Ag), IVb (Ti, Zr, Hf) та Vb (V, Nb, Ta) підгруп, для альтернативної електрохімічної енергетики».

Дисертаційна робота М. О. Ходикіної написана українською мовою та має класичну структуру. Вона складається з Анотації/Summary, Змісту, Переліку умовних позначень, Вступу, п’яти розділів, Висновків та Списку використаних джерел. Роботу викладено на 136 с. машинописного тексту з дотриманням в цілому основних правил оформлення дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня кандидата та доктора наук відповідно до ДСТУ 3008-95 «Документація. Звіти у сфері науки і техніки. Структура і правила оформлення».

Робота містить 51 рисунок та 30 таблиць.

У **Анотації/Summary** українською та англійською мовою стисло висвітлено мету роботи, її основні результати та висновки, зроблені на їхній основі, наведено ключові слова, які описують зміст роботи, та подано список публікацій здобувача за матеріалами дисертації.

Список авторських публікацій по темі дисертації містить 17 позицій: **6** статей у фахових виданнях (в т.ч. **2** – у міжнародному виданні *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*, яке реферується наукометричною базою *Scopus*) та **11** тез

доповідей на конференціях різного рівня. Аналіз опублікованих тез доповідей на наукових конференціях та симпозіумах свідчить про достатню апробацію практично всіх розділів поданої дисертаційної роботи.

У **Переліку умовних позначень** наведено абревіатури, позначення основних параметрів та їхніх розмінностей, а також скорочень, які були використані в тексті дисертаційної роботи.

У **Вступі** розкрито актуальність вибраної тематики наукових досліджень, показано їх зв'язок з науковими планами та темами. Автор достатньо чітко сформулювала мету роботи – з'ясувати закономірності впливу природи неорганічного носія на зв'язування нативних ферментних препаратів (НФП) класу оксидоредуктаз, а також застосування одержаних гетероструктур (ГС) як активних мас електродів для енергоперетворюючих пристроїв та біосенсорів, а також перелік завдань, які необхідно було розв'язати для досягнення цієї мети. Далі подано відомості про об'єкт, предмет та методи досліджень, представлено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, внесок в дисертаційну роботу особисто здобувача та основних співавторів її публікацій, апробацію одержаних результатів, відомості про публікації за матеріалами дисертації, структуру та обсяг дисертаційної роботи.

У **Розділі 1 Фізико-хімічні властивості органомінеральних гетероструктур (літературний огляд)** розглянуто структурні особливості та будову оксидоредуктаз, механізми формування їхньої редокс-активності, а також електрохімічні властивості. Окрім того проаналізовано види, методи та механізми іммобілізації ферментів на неорганічних носіях, практичне застосування органо-мінеральних ГС в електрохімічних пристроях. Розділ закінчується постановкою завдань досліджень – формулюванням мети роботи та завдань, які необхідно вирішити для її досягнення.

У **Розділі 2 Експериментальні методики та апаратура** дано характеристику вихідних реагентів, неорганічних носіїв та нативних ферментних препаратів, наведено опис методик виділення НФП з редьки, його іммобілізації та визначення ферментативної активності тощо. Детально розглянуто основи електрохімічної імпедансної спектроскопії, а також наведено інформацію про складне наукове обладнання, використане під час досліджень, методики підготовки зразків та формування електродів на основі ГС для електрохімічних досліджень.

У **Розділі 3 Фізико-хімічні властивості системи неорганічний носій – ферментний препарат як гетероструктури** наведено результати досліджень хімічного складу ФНП та властивості, головно спектральні, ГС, синтезованих на основі бентоніту, його H^+ -модифікованої форми, каоліну та аеросилу А-300. Виявлено присутність у НФП чотирьох основних іонів металів, а саме Fe(III), Cu(II), Ni(II), Zn(II), що свідчить, на думку здобувача, про формування різних каталітичних і адсорбційних центрів білкової молекули. Показано, що основний вплив на функціональні властивості ГС має кількість кислих і основних центрів на поверхні носія.

Результати досліджень морфології отриманих ГС та їхніх редокс-властивостей подані у **Розділі 4 Формування редокс-активності гетероструктур на основі неорганічних носіїв і ферментного препарату**. Показано, що кислотно-основні властивості поверхні неорганічного носія визначають активність іммобілізованого на ньому ферментного препарату. Запропоновано склад активного центру, утвореного іммобілізованим НФП, а також показано, що його редокс-активністю можна керувати, використовуючи носіїв з переважаючим різним (електронним або протонним) типом провідності. Окрім того, запропоновано метод оцінки впливу матеріалу носія на редокс-активність та стабільність у часі ГС на основі результатів імпедансної спектроскопії.

Розділі 5 Застосування гетероструктур ферментний препарат – неорганічний носій в електрохімічних пристроях присвячений дослідженню електрохімічних властивостей синтезованих ГС, які були апробовані у електродах суперконденсаторів та біосенсорів для визначення глюкози. Показано можливість використовувати синтезовані ГС на основі каоліну та А-300 у суперконденсаторах, а ГС на основі бентоніту і його модифікованої форми – як платформ для амперометричних біосенсорів на глюкозу.

Кожен розділ починається зі вступу, де обґрунтовується необхідність проведення досліджень, результати яких наведені у ньому, та закінчується узагальненнями або деталізованими висновками щодо представленого матеріалу.

У **Висновках** подано основні узагальнені результати, отримані здобувачем в ході виконання роботи.

Список використаної літератури містить **151** посилання, з яких майже 2/3 та більше 1/4 вийшли з друку протягом останніх 15 (після 2002 року) та п'яти (після 2012 року) років, відповідно.

В ході виконання дисертаційної роботи здобувачем **вперше** одержано низку важливих та цікавих наукових результатів, зокрема:

- з'ясовано, що кислотно-основні властивості носія є основним фактором впливу на селективність зв'язування ферментів з суміші, при цьому наявність основних центрів забезпечує сенсорну активність одержаних ГС, тоді як кислотних – здатність до накопичування енергії;
- запропоновано, що зміна селективності зв'язування ферментів НФП різними мінеральними сорбентами пов'язана з наявністю у структурі ензимів іонів металів різної природи;
- доведено, що формування ГС в результаті іммобілізації ензиму призводить до зміни природи електропровідності з електронної на протонну (або навпаки) залежно від природи (функціоналізації) поверхні неорганічного носія;
- знайдено нові ГС, здатні протягом тривалого періоду часу зберігати каталітичну активність.

Не викликає сумніви **практична значимість** даної роботи, насамперед для створення нових типів суперконденсаторів та біосенсорів. Зокрема створений на основі графену, НФП та аеросилу А-300 макет електрохімічного конденсатора продемонстрував питому ємність до 95 Ф/г, що відповідає рівню найкращих сучасних зразків. Окрім того, виявлені можливість використання ГС на основі бентоніту та його Н⁺-модифікованої форми як чутливого шару високочутливих біосенсорів для визначення глюкози.

Автореферат адекватно відображає зміст дисертаційної роботи, містить усі необхідні пункти стислого опису дисертації. Наводиться достатньо детальний опис результатів дослідження. Загальна характеристика роботи, її основні положення та висновки в дисертації і авторефераті **тотожні**.

Детальне ознайомлення з дисертаційною роботою дає підстави стверджувати, що чітке формулювання здобувачем мети роботи, використання взаємодоповнюючих методів дослідження (ІЧ, УФВ та атомно-адсорбційна спектроскопія, скануюча електронна мікроскопія, циклічна вольтамперометрія та спектроскопія електрохімічного імпедансу тощо), а також всебічний аналіз літературних джерел та отриманих експериментальних і теоретичних результатів дали змогу здобувачу успішно розв'язати поставлені завдання досліджень та сформулювати **обґрунтовані висновки**, що свідчить про **завершеність** дисертаційної роботи в рамках поставлених завдань, а також **достовірність отриманих результатів**.

Водночас до матеріалу, викладеного в дисертаційній роботі, виникли наступні зауваження та побажання, а саме:

1. Назва дисертаційної роботи відповідає суті проведених досліджень, є лаконічною та інформативною. Водночас виникло застереження щодо використання як в назві роботи, так і далі терміну «*гетероструктури*» (ГС). В сучасній науці усталилося, що під терміном «*гетероструктура*» розуміють насамперед епітаксіально отриману багат шарову структуру з різних напівпровідників, коли внаслідок різної ширини забороненої зони між ними формується т. зв. гетероперехід. Тому, на нашу думку, більш коректним було б використовувати замість поняття «*формування гетероструктур*» терміни «*формування адсорбційних комплексів*» або просто «*імобілізація ферментів*». Водночас автор мав би в Розділі 1 розкрити своє розуміння терміну «*гетероструктури*» та детальніше проаналізувати стан досліджень в цій галузі стосовно аналогічних до досліджуваних здобувачем об'єктів, проте такі підрозділи в дисертації відсутні.
2. Об'єктом дослідження, за автором, є *гетероструктури* ... Проте, згідно з діючими вимогами до дисертаційних робіт [Бюлетень ВАК України, № 6 (2007) 42], об'єкт – це «... **процес або явище, що породжує проблемну ситуацію й обране для вивчення**». Тому можна запропонувати, що об'єктом досліджень могло б бути *формування гетероструктур* або їх *каталітична активність*.

3. Виникають запитання щодо окремих експериментальних деталей (насамперед **Розділ 2**), які можуть бути суттєвими для інтерпретації отриманих результатів. Зокрема бажано було б з'ясувати/деталізувати такі положення дисертаційної роботи:
- у **Розділі 2.1.2** вказано, що при формуванні ГС неорганічний носій заливали розчином ФНП, проте нічого не сказано чи відбувалося це при перемішуванні, оскільки в протилежному випадку є малоймовірним, що адсорбція ензиму відбудеться на всіх частинках мінералу, а не лише на тих, які безпосередньо контактують з розчином;
 - не зрозуміло на основі чого ґрунтувалося визначення залишкового вмісту НФП під час його сорбції на неорганічних носіях фотоколориметричним методом (**Розділ 2.2.1**, с. 54), зокрема поглинання якої речовини відповідає максимум при 403 нм (рис. 2.1), тим більше, що у **Розділі 2.2.6** сказано, спектрофотометрія ферментних препаратів здійснювали при довжині хвилі 580 нм. Окрім того потребує пояснення, що розумів дисертант під поняттям об'ємна концентрація екстракту (відносно чого?);
 - дуже суб'єктивним виглядає визначення ізоелектричної точки НФП (**Розділ 2.2.4**), яка відповідала «... рН найбільш каламутної суміші ...», оскільки, судячи з опису методики, оцінка мутності відбувалася суто візуально;
 - **Розділ 2.2.5** називається «Визначення компонентного складу ферментного препарату, проте реально дисертант визначала лише вміст певних металів в екстрактах, отриманих з рослинної сировини (редьки). При цьому слід приймати до уваги, що ці ж метали не обов'язково мають бути у складі ферментів, а можуть просто накопичуватися рослинами залежно від складу ґрунту;
 - необхідно уточнити який саме Ag/AgCl електрод використовували як електрод порівняння в електрохімічних дослідженнях (с. 60);
 - у **Розділі 2.2.9** відсутній опис методики безпосереднього нанесення ГС на графен, тому залишається нез'ясованим яким чином досягалася рівномірність нанесення шару, його товщина та якість. Більше того, є незрозумілим стосовно площі чого вказано використовувати наважки ГС (3 мг/см², підписи до рис. 5.1–5.7). Якщо площі графену, то це не узгоджується з даними на с. 66, де вказано наважку масою 0,03 г (30 мг), яку наносили на графенову підкладку площею 1×1 см;
 - незрозумілими є результати, наведені на рис. 5.11 та 5.13, оскільки (як ілюстровано) при додаванні різних аліквот визначуваного субстрату (глюкози) амперометричні відгуки сенсорів є ідентичні. На величину аналітичного сигналу впливатиме також потенціал робочого електрода, проте за яких значень цього параметру здійснювалося дослідження сенсорних властивостей в тексті роботи не зазначено. Як результат, спостерігаємо від'ємний відгук сенсора (рис. 5.14), тобто протікання процесу відновлення, тоді як аналітичною реакцією є окиснення гідроген пероксиду. Окрім того, бажано було б навести у роботі значення сенсорних характеристик сконструйованих макетів сенсорів, як то чутливість до

визначуваного субстрату, межі лінійності відклику, мінімальну визначувану концентрацію тощо;

- для більшості експериментальних результатів не наведено похибку отриманих значень, що відразу викликає запитання щодо кількості проведених паралельних дослідів, а також відтворюваності результатів.
4. Перевагою (зокрема доступність) і, водночас, недоліком (широке коливання активності НФП залежно від використаної сировини) представленої роботи є використання не індивідуально виділених ферментів, а їхньої суміші. Тому, на нашу думку, в подальшому необхідно провести повний біохімічний аналіз отриманого екстракту з рослинної сировини для з'ясування якісного та кількісного ферментного складу НФП, оскільки лише оксидоредуктази мають 22 підкласи. Лише з'ясувавши, яку функцію відіграють чотири види визначуваних іонів у НФП (входять в склад кофактора, є активатором ензиму чи просто накопичені рослинною сировиною з оточуючого середовища), можна зробити обґрунтовані висновки щодо можливої природи каталітичних та адсорбційних центрів білкових молекул, які іммобілізуються на поверхні неорганічних носіїв різної природи, механізму зв'язування, каталітичної активності отриманих ГС, можливість синергетичного ефекту і т.д. Тому окремі положення роботи, зокрема що стосується зв'язування саме іонів, а не активних центрів ензимів, в склад яких вони входять (с. 81), віднесення активних центрів до певних типів ензимів (с. 86), складу макроструктури активного центру, який утворює іммобілізований НФП (с. 103) тощо видаються нам малообґрунтованими.
5. Бажано дати детальнішу інтерпретацію / уточнити також такі положення роботи:
- очевидно, що під час іммобілізації НФП на неорганічних носіях саме кислотні або основні центри на їхній поверхні виступають адсорбційними центрами. Тому логічно, що в результаті утворення ГС кількість тих чи інших центрів в результаті зв'язування з ензимами має зменшуватися. Проте, згідно з даними таб. 3.4, для модифікованого бентоніту спостерігається збільшення кількості основних центрів, а для каоліну – як основних, так і кислотних. Яким чином?
 - у роботі дисертант постійно використовує поняття *«редокс-активності»* ферментів, НФП чи ГС. Що мається на увазі, оскільки, з нашої точки зору, адекватніше було б використовувати термін *«каталітична активність щодо редокс-процесів»*?
 - яким чином (алгоритм, програмне забезпечення тощо) виділяли смугу, яка відповідає *d-d*-переходу іона Cu(II) (рис. 3.5), та розділяли її на складові (рис. 3.6);
 - незрозуміло про розрив (гідроліз) яких глюкозидних зв'язків ідеться у **Розділі 4.1**, оскільки оксидоредуктази не відносяться до глікопротеїнів, які містять окрім білка також групу гетероолігосахариду (як то гормони, інтерферони, мембранні та рецепторні білки тощо);
 - не можна погодитися з твердження на с. 106 про те, що *«На ЦВА (гетероструктур у нас. розчині KCl) фіксується відсутність електродних реакцій ...»*. Яскравим прикладом може слугувати різниця у формах гілок ЦВА на рис. 5.5. Якщо

для анодної (симетричної) гілки ЦВА можна дійсно стверджувати про відсутність фарадеївського процесу, то форма катодної (асиметричної) гілки свідчить про протікання відновлюваного процесу за потенціалів $\approx -0,7$ В. Водночас для інших ГС на основі форми ЦВА можна стверджувати про протікання не лише катодного, але й анодного процесів. Тому виникає питання чи враховувалося протікання фарадеївських процесів при визначенні ємності матеріалів отриманих на основі відповідних ГС?

6. Оформлення роботи є добре, проте:

- **Перелік умовних позначень** (с. 18–19) складено не строго у алфавітній послідовності. Окрім того викликають подив розмірності питомої електропровідності ($\text{См}/\text{см}^2$), а також об'ємної концентрації речовини (%);
- якість наведеного в роботі графічного матеріалу є високою. Проте незручним є те, що посилання на частину цих матеріалів наводиться на наступній сторінці – вже після представлення відповідних рисунків чи таблиць у тексті, як це, наприклад, має місце для рисунків 3.1, 3.5, 3.6, 5.2, 5.5 і т.д. Посилання на рис. 4.10 відсутнє, а він сам не обговорений в тексті роботи. У підписах до рисунків з **Розділу 1**, а також структур представлених у табл. 2.1, відсутні посилання на першоджерела, де вони були опубліковані. На наш погляд, також було б доцільним дати посилання на публікації автора за темою дисертації у підписах до рисунків чи таблиць у **Розділах 3–5**. Окрім того, дещо дивним є представлення циклічних вольтамперограм (рис. 5.1–5.7), коли значення абсциси та ординати збільшуються відповідно не зліва направо та знизу вверх, а навпаки;
- в роботі зустрічаються сленгові вирази, кальки з російської та описки, зокрема: 1) «кислі центри» замість «кислотні центри»; 2) «в якості» замість «як», «в порівнянні з» замість «порівняно з», «окислення» замість «окиснення», «мультиточечне» замість «мультиточкове» (с. 37), «5000–11000 см^{-1} » замість «50000–11000 см^{-1} » (с. 65), «токоподвод» замість «струмопідвід» (с. 65), «зміст іонів» замість «вміст іонів» (табл. 3.1), «полуацетальна» замість «напівацетальна» (с. 71);), «висловимо» замість «виразимо» (с. 71), «збільшення навішування» замість «збільшення ?...» (с. 71) тощо; 3) замість посилань на табл. 4.3 (с. 72) і рис. 4.2 (с. 81) мали б бути посилання на табл. 3.5 та рис. 3.6, незрозумілі деякі змінні у формулах на с. 91;
- певні зауваження викликає **Список використаної літератури**, оскільки у ньому використано різні стилі оформлення використаних у роботі літературних першоджерел, наприклад для [129] та [130].

Вказані зауваження, більшість з яких мають характер побажань, не знижують загальну високу оцінку роботи, а також не впливають на результати та основні висновки дисертаційної роботи, яка є **цілісним та завершеним науковим дослідженням** в рамках поставлених завдань.

На основі вищесказаного можна зробити такі висновки щодо поданої дисертаційної роботи:

1. За актуальністю обраної теми, обсягом, достовірністю та рівнем апробації отриманих експериментальних результатів, науковою новизною, обґрунтованістю висновків, практичною цінністю дисертаційна робота “Формування гетероструктур в системі неорганічний носій – нативний ферментний препарат класу оксидоредуктаз” **відповідає** вимогам пп. 9 та 11–14 «**Порядку присудження наукових ступенів**», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року зі змінами, внесеними Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19 серпня 2015 року, № 1159 від 30 грудня 2015 року та № 567 від 27 липня 2016 року.
2. Дисертаційна робота **відповідає** **Паспорту спеціальності** 02.00.04 – фізична хімія за такими пунктами:
 - *Теорія хімічних реакцій, кінетика й механізм реакцій у газах, рідинах, твердих тілах і молекулярно організованих системах.*
 - *Поверхневі явища: адсорбція, адсорбенти, іонообмінники.*
 - *Взаємозв'язок хімічної будови речовин з їх реакційною здатністю.*
3. Кількість та якість наукових праць Ходикіної М. О., опублікованих за результатами дисертаційної роботи, **відповідає** Наказу № 1112 МОНмолодьспорту України від 17 жовтня 2012 року «**Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук**» із змінами, внесеними згідно з наказами МОНмолодьспорту України № 1380 від 3 грудня 2012 року та № 365 від 21 березня 2013 року.
4. Здобувач Ходикіна Марія Олегівна **заслужує** **присудження** наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 – фізична хімія.

23 червня 2017 року

Офіційний опонент –

завідувач кафедри фізичної та колоїдної хімії
Львівського національного університету
імені Івана Франка МОН України,
доктор хімічних наук, професор

О. В. Решетняк

Власноручний підпис професора Решетняка О.В. підтверджую.

Вчений секретар Львівського національного
університету імені Івана Франка МОН України,
кандидат філологічних наук, доцент



О. С. Грабовецька