



Prof. dr hab. Magdalena Skompska
Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa,
tel. (48) 22 55 26 411
e-mail: mskomps@chem.uw.edu.pl



Warszawa, 20.11.2016

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Marty Radomskiej

Praca doktorska Pani mgr Marty Radomskiej, pt.: „**Projektowanie i charakterystyka fizykochemiczna hybrydowych układów do utleniania glukozy**” została wykonana w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej pod kierunkiem Prof. dr hab. Pawła Kuleszy.

Procesy enzymatyczne od lat cieszą się wielkim zainteresowaniem naukowców nie tylko dlatego, że zaliczają się do kluczowych procesów metabolicznych przebiegających w żywych organizmach, ale również ze względu na to, że mogą być one wykorzystywane w enzymatycznych ogniwach paliwowych oraz w biosensorach stosowanych w analizie klinicznej, środowiskowej i przemysłowej. Do wszystkich tych zastosowań potrzebne są układy zapewniające dużą szybkość transportu ładunku między elektrodą i centrum aktywnym w enzymie, a jednocześnie charakteryzujące się dużą stabilnością, dobrą powtarzalnością oraz łatwością wykonania. W tym kierunku od lat prowadzone są badania w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie.

Praca doktorska mgr Marty Radomskiej dobrze wpisuje się w ten nurt badań. W trakcie jej realizacji opracowane zostały metody wytwarzania układów hybrydowych do utleniania glukozy, w których materiałem aktywnym (katalizatorem biologicznym) był modelowy enzym – oksydaza glukozy, naniesiony na elektrodę GC pokrytą nanorurkami węglowymi zmodyfikowanymi kwasem 4-pirol-1-yl benzoesowym. Przygotowano kilka różnych układów zarówno z mediatorami (siarczanem N-metylofenazyny i tetratiafulwalenem) ułatwiającymi przeniesienie elektronów między elektrodą i centrum aktywnym enzymu, a także bez mediatora, ale zawierające pallad katalizujący odwracalną reakcję uwodornienia centrum aktywnego w enzymie.

Przedłożony mi do oceny tekst rozprawy obejmuje 138 stron tekstu, z których 55 stron stanowi *Część Literaturowa*. *Część Eksperymentalna* (licząca 78 stron tekstu) zawiera szczegółową dyskusję wyników, zilustrowanych na 86 rysunkach, a *Bibliografia* obejmuje 197 pozycji.

W *Części Literaturowej* omówione zostały mikrobiologiczne i enzymatyczne bioogniwa paliwowe oraz biosensory enzymatyczne, a w szczególności zasady ich działania, sposoby unieruchamiania enzymów na elektrodzie oraz istota procesów przeniesienia elektronu między enzymem i elektrodą. Ponieważ składnikami układów hybrydowych opracowanych przez Doktorantkę były również nanorurki węglowe i polimery przewodzące, w pracy znalazły się również krótkie rozdziały poświęcone metodom ich wytwarzania i ich właściwościom. Ta część pracy zawiera wszystkie niezbędne informacje na temat pojęć i reakcji przebiegających w projektowanych i badanych przez Doktorantkę układach, a także na temat stosowanych w pracy metod badawczych.

Moje uwagi merytoryczne do tej części pracy są nieliczne.

1. Na stronie 35 Autorka podaje jednostki, w których podawany jest poziom glukozy we krwi. O ile wymiar mg/dL nie budzi wątpliwości, to jednostki określone jako „nm” lub „mm” są chyba niewłaściwe.
2. Na stronie 47 Autorka pisze, że bipolarony (dikationy) tworzone są „w następstwie rekombinacji polaronów”. To prawda, że jest to jedna z możliwości ich powstawania. Druga droga prowadzi poprzez utlenianie polaronów, które może odbywać się zarówno metodą chemiczną jak i elektrochemiczną.
3. Na stronie 56 Autorka pisze, że w przypadku zależności chronoamperometrycznych na początku pomiaru rejestrowany prąd osiąga maksimum, a następnie maleje wykładniczo, natomiast przebieg krzywej przedstawionej na Rys. 21 nie odzwierciedla tego opisu.
4. Opis spektroskopii w podczerwieni (str. 63), zajmujący pół strony jest bardzo powierzchowny. Z tego opisu trudno zorientować się, dlaczego ta metoda była stosowana w badaniach prowadzonych przez Doktorantkę. Zdaniem recenzentki, opis metod powinien być użyteczny dla czytelników pracy, albo należy z niego zrezygnować.
5. Na stronie 66 w Rozdziale 6 dotyczącym stosowanych odczynników i aparatury, Autorka pisze, że typy w badaniach AFM były wykonane z silikonu. Autorka miała zapewne na myśli krzem.
6. Wśród stosowanych elektrod Autorka wymienia „siateczki niklowe wykorzystywane jako podłoże do badań technika TEM” W badaniach tych siateczki Ni nie pełnią roli elektrod.

Ocena Części Eksperymentalnej

W części eksperymentalnej Doktorantka przygotowywała różnorodne układy hybrydowe na bazie zmodyfikowanych nanorurek węglowych (CNT) i enzymu (GOx), zawierające opcjonalnie mediator elektronów (NMP lub TTF), polimer przewodzący (PEDOT) i nanocząstki metalu (Pd). W kolejnych etapach przygotowania każdego z układów przeprowadzone zostały szczegółowe badania mające na celu określenie wpływu poszczególnych komponentów na odpowiedź elektrochemiczną układu. Szkoda, że między częścią literaturową a eksperymentalną nie pojawił się choćby krótki rozdział spinający te dwie części, zawierający hipotezę badawczą oraz oczekiwania dotyczące parametrów zaprojektowanych układów w stosunku do tych, opublikowanych dla podobnego typu układów w literaturze.

Pierwszy rozdział części eksperymentalnej dotyczy układów hybrydowych CNT/PyBA z mediatorem (NMP) i oksydazą glukozy. Zbadano wpływ poszczególnych składników na dynamikę transportu ładunku w warstwie i wpływ kolejności nakładania enzymu na stabilność układu służącego do utleniania glukozy.

Do tej części pracy mam sporo merytorycznych uwag wymagających szczegółowej dyskusji i ponownej analizy wyników:

1. Według podpisu pod Rysunkiem 20 (str. 70) woltamperogramy cykliczne uzyskane zostały w trakcie elektrochemicznej polimeryzacji N-metylofenazyny (NMP). Na krzywych nie obserwuje się jednak charakterystycznego dla polimeryzacji prądu utlenienia monomeru. Jaki jest więc mechanizm tego procesu i jaka może być struktura uzyskanego polimeru? Na Rys. 34 porównane zostały widma NMP w pastylce KBr i osadzonego na płytce z węgla szklanego. W przypadku pierwszego widma piki zostały przypisane konkretnym drganiom, natomiast nie dokonano żadnej analizy widma warstwy osadzonej na elektrodzie (oprócz

stwierdzenia, że widmo jest zmienione). Ponadto błędnie została opisana oś odciętych - nie jest to na pewno długość fali. Taki sam błąd w opisie skali popełniony został na Rys. 63.

2. Na voltamperogramie cyklicznym elektrody pokrytej warstwą NMP, przedstawionym na Rys. 30, widoczne są dwie pary pików redoks. Jakim reakcjom przypisać można te piki? Różnica między potencjałami pików utleniania i redukcji dla pary usytuowanej przy bardziej dodatnich potencjałach (para I) wynosi 61 mV, a dla drugiej pary 29 mV. Doktorantka pisze, że te wartości są bliskie „wartości świadczącej o przebiegu odwracalnego procesu powierzchniowego”. To dość zaskakujące stwierdzenie, bowiem w takim przypadku piki powinny być idealnie symetryczne, czyli ΔE powinna wynosić zero. Uzyskana wartość ΔE dla pików pary I jest nie tylko daleka od oczekiwanego zera, ale bliska wartości 59 mV/n typowej dla odwracalnego procesu kontrolowanego dyfuzją. Jak wytłumaczyć więc tę rozbieżność? Autorka wykonała również test zależności prądu piku od szybkości przemiatań w zakresie od 1 do 170 mV/s. Z rysunków zamieszczonych na str. 72 wynika jasno, że nie jest to zależność liniowa, choć Doktorantka doszukuje się takiej zależności w zakresie od 1 do 16 mV/s, czyli dla trzech z 12 punktów pomiarowych. Według recenzentki wniosek wyciągnięty z tych wyników jest nieprawidłowy. Dlaczego nie został wykonany również test zależności gęstości prądu piku od pierwiastka z szybkości polaryzacji?

Ponadto, gęstości prądu przedstawione na Rys. 31 nie zgadzają się z tymi na Rys. 32. Dla najwyższej szybkości przemiatań gęstość prądu anodowego piku I wynosi ok. 0.4 mA cm⁻², natomiast na Rys. 32 wynosi ona 40 mA cm⁻², co jest wartością nieprawdopodobnie wysoką dla tego typu procesów. Podobna uwaga dotyczy Rysunku 39 na stronie 77 – gęstości prądu na zależnościach j-v są rzędu kilkuset mA/cm⁻², co jest nierealne.

3. Wzrost gęstości prądu w trakcie osadzania NMP na powierzchni elektrody (Rys. 29) został przez Autorkę przypisany narastaniu kolejnych warstw mediatora, natomiast dalej postulowane jest monowarstwowe pokrycie powierzchni mediatorem. Jak wyjaśnić tę niekonsekwencję w rozumowaniu?
4. Po zbadaniu zachowania elektrochemicznego warstwy NMP na elektrodzie GC Doktorantka osadziła NMP na warstwie nanorurek węglowych nakroplonych na powierzchnię elektrody GC. Czy oszacowana została powierzchnia aktywna takiej elektrody np. poprzez badanie reakcji redoks ferrocenu? Jaka powierzchnia elektrody została przyjęta do wyznaczenia gęstości prądu? Z pola powierzchni pod pikem utleniania wyznaczone zostało pokrycie elektrody cząsteczkami mediatora. Uzyskana wartość 2.3×10^{-8} mol/cm² przypisana została pokryciu monowarstwowemu. Wartość ta jest o rząd wielkości większa od tej uzyskanej dla NMP osadzonego na elektrodzie bez nanorurek i dwa rzędy wielkości większa od wartości postulowanej w literaturze dla pokrycia monowarstwą (strona 55). Może informacje dotyczące powierzchni elektrody pokrytej nanorurkami pomogłyby w uzasadnieniu tych rozbieżności.

Podobnie jak w poprzednim przypadku wykres zależności j_p od v (Rys. 77) nie jest liniowy nawet w niewielkim zakresie szybkości przemiatań, natomiast Autorka wnioskuje na podstawie liniowości tego wykresu o powierzchniowym charakterze tego procesu.

5. W tym aspekcie wyjaśnienia wymaga sprawa pomiarów chronokulometrycznych. Jak rozumiem celem tych eksperymentów było zbadanie dynamiki transportu ładunku w warstwie. Problem jednak polega na tym, że jeśli Autorka postulowała pokrycie elektrody monowarstwą, to nie rozumiem jaki będzie wobec tego sens fizyczny wyznaczonego z tych pomiarów współczynnika dyfuzji.

6. Autorka przypisuje wypłaszczenie na krzywej chronokulometrycznej zajściem „całkowitej elektrolizy” w warstwie. Czy w warstwie zachodzi rozkład substancji? Chyba Autorka miała na myśli całkowite utlenienie warstwy.
7. Po wprowadzeniu enzymu do warstwy (czyli dla układu CNT/PyBA_NMP_GOx) na krzywych woltamperometrycznych przedstawionych na Rys.42 można zauważyć zmianę względnej wysokości pików I i II. Pik I (przy mniej ujemnym potencjale) stał się znacznie niższy od pików II, podczas gdy w przypadku braku enzymu była sytuacja odwrotna (Rys. 37). Czemu można przypisać tę zmianę? Co ciekawe, sytuacja wraca „do normy” gdy warstwa NMP nałożona jest po nakropleniu enzymu.
8. O ile zgadzam się z Autorką w sprawie różnego nachylenia liniowych fragmentów krzywych chronokulometrycznych przedstawionych na Rys. 41, to w przypadku zależności przedstawionych na rys. 48 moim zdaniem nachylenia są jednakowe, jeśli pod uwagę weźmie się proporcjonalnie taki sam fragment wykresu.
9. Na stronie 92 Autorka pisze: „Zbadano również jaki wpływ na gęstość prądową utlenienia glukozy ma stężenie oraz ilość segmentów elektroosadzania mediatora” Domyślam się, że chodzi tu o liczbę cykli woltamperometrycznych wykonanych w trakcie osadzania mediatora.
10. W jaki sposób wyznaczona została aktywność molekularna enzymu? Na str. 94 Autorka ocenia, że otrzymany stosunek aktywności molekularnej do stałej Michaelisa –Menten jest wysoki, ale jest to trudno ocenić bez odniesienia do wartości literaturowych.
11. Autorka w wielu miejscach w tekście używa niefortunnego w moim odczuciu określenia „cyklizacja elektrody” lub „woltamperometryczna cyklizacja” gdy w eksperymentach stosowana była chronowoltamperometria cykliczna z wieloma następującymi po sobie cyklami zmian potencjału.

Następny rozdział Części Eksperymentalnej (Rozdział 7.3) dotyczy elektrod zmodyfikowanych poprzez osadzenie warstwy CNT/PyBA/PEDOT metodą elektrochemiczną. Polimer ma tu pełnić rolę matrycy do unieruchomienia biokatalizatora i stabilizatora układu. Doktorantka wykazała, że wprowadzenie PEDOTu do warstwy hybrydowej powoduje wzrost jej mechanicznej trwałości. Czy PEDOT jako polimer przewodzący może również pełnić rolę mediatora w procesie przeniesienia ładunku?

W dalszych eksperymentach układ CNT/PyBA/PEDOT był podłożem dla kolejnej warstwy modyfikowanych nanorurek z mediatorem TTF (tetratriafulwalen), na który nakroplony został enzym. Wykazano, że TTF jest bardzo dobrym mediatorem ładunku, bowiem dzięki obecności układu sprzężonych wiązań podwójnych może oddziaływać z nanorurkami węglowymi ułatwiając w ten sposób transport elektronów.

Opracowane układy były badane w podobny sposób jak te z mediatorem NMP i dlatego niektóre moje wcześniejsze uwagi dotyczące interpretacji wyników zostaną powtórzone.

12. Na stronie 103 pojawia się ponownie stwierdzenie, że różnicę między potencjałami pików utleniania i redukcji wynoszącą 65 mV można uznać za bliską zero i wnioskować o przebiegu odwracalnego procesu powierzchniowego (dla układu CNT/PyBA/TTF). Podobnie jak w poprzednich przypadkach wyznaczony stopień pokrycia mediatorem rzędu 10^{-8} mol/cm² został uznany za pokrycie monowarstwowe. Najlepiej byłoby tą wartość zweryfikować poprzez oszacowanie powierzchni aktywnej nanorurek stosując układ redoks, a następnie poprzez określenie spodziewanej wielkości pokrycia tej powierzchni monowarstwą, korzystając z oszacowanej teoretycznie wielkości pojedynczej cząsteczki.

Taka sama uwaga dotyczy układu GC/TTF wytworzonego na elektrodzie poprzez nakroplenie roztworu mediatora. Moim zdaniem już sama procedura przygotowania elektrody wyklucza osadzenie monowarstwy.

13. Podobnie jak w poprzednich przypadkach nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem, że zależność przedstawiona na Rys. 67 jest chociaż w pewnym zakresie prostoliniowa. Podobna uwaga dotyczy wykresu 71. Linię prostą trudno jest poprowadzić nawet przez pierwsze 3 punkty pomiarowe. Dlaczego nie wykreślono również zależności gęstości prądu od pierwiastka z szybkości przemiatania by postawić prawidłową diagnozę dotyczącą typu badanego procesu?
14. Co Autorka miała na myśli pisząc (strona 108), że nanorurki węglowe pomagają w dystrybucji elektronów?
15. W wielu miejscach w tekście (np. str. 103, Autorka posługuje się niezbyt fortunnym określeniem „potencjał formalny pików”. Potencjał formalny odnosi się do układu redoks, a można go wyznaczyć z położenia pików utleniania i redukcji tego układu.

Trzeci typ układów syntezowanych i badanych przez Doktorantkę w reakcjach utlenienia glukozy (omówiony w Rozdziale 8) nie zawierał mediatora. Aby jednak umożliwić transport ładunku między elektrodą a centrum aktywnym enzymu, na nanorurki węglowe zmodyfikowane tak jak poprzednio PyBA, osadzony został pallad/tlenek palladu, na który nakroplono enzym. Osadzenie Pd/PdO odbywało się metodą elektrochemiczną i szkoda, że w pracy nie zostały przedstawione przebiegi zależności voltamperometrycznych otrzymanych w trakcie tego procesu. Warto byłoby w tym miejscu przedstawić jakieś dane na temat elektrochemicznych właściwości Pd, które uzasadniałyby stwierdzenie, że Pd pokryty jest warstwą tlenu.

Do tej części pracy mam znacznie mniej uwag niż do poprzednich i dotyczą one głównie sposobu prezentacji wyników.

16. Autorka sugeruje, że Pd osadzony na nanorurkach katalizuje reakcje uwodornienia FAD do FADH₂ dzięki powinowactwu wodoru do Pd. Czy obecność tlenu nie ma wpływu na ten proces?
17. Nie podobają mi się uproszczenia w opisie, typu: „*pokrycie powierzchni dla pików anodowego*” zamiast „*pokrycie powierzchni określone z powierzchni pod pikiem anodowym*” czy też „*elektroosadzanie poprzez cyklizowanie przez 25 segmentów*” dla określenia, że elektroosadzanie odbywało się metoda voltamperometrii cyklicznej w ciągu 25 cykli.
18. Zmiany w położeniu potencjałów pików katodowych i anodowych przy wzroście szybkości przemiatania przedstawiono w tabeli 5. Znacznie lepiej byłoby gdyby te zależności zostały zilustrowane na wykresie.
19. Podpisy pod Rysunkami 96 i 97 są trochę mylące ponieważ brakuje w nich informacji, że różne stężenia PdCl₂ odnoszą się do roztworów stosowanych do osadzenia palladu.
20. Dlaczego w przypadku elektrody GC/CNT_Pd/PdO_GOx najwyższe prądy utleniania i redukcji w reakcji FAD/FADH₂ i prądy redukcji tlenu uzyskano gdy stężenie PdCl₂ w procesie przygotowywania elektrody wynosiło 0.4 mM, a przy wyższym stężeniu wyniki były już mniej korzystne?

Podsumowanie:

Pani mgr Marta Radomska w swojej rozprawie przedstawiła obszerny materiał eksperymentalny dotyczący przygotowania układów kompozytowych zawierających nanorurki węglowe i enzym, zarówno z mediatorem jak i bez mediatora. Wytworzone przez Nią układy wykazywały dobrą aktywność katalityczną w reakcji elektrootleniania glukozy i dobrą stabilność. Zastosowanie nanocząstek Pd umożliwiło zwiększenie ilości unieruchomionego enzymu i ułatwiło przeniesienie elektronu między enzymem i elektrodą bez zastosowania dodatkowego mediatora.

Część wyników przedstawionych w dysertacji, dotyczących układu CNT/PyBA/TTF, została opublikowana w renomowanym czasopiśmie *Electroanalysis*. Co ciekawe, w pracy tej nie zauważyłam błędów interpretacyjnych, które wymieniłam powyżej. Większość wyników doświadczalnych została przez Doktorantkę zinterpretowana poprawnie, a moje uwagi krytyczne odnoszą się przede wszystkim do analizy zależności chronowoltamperometrycznych. Uwagi te jednak nie podważają najważniejszych wyników pracy. Ze względu jednak na fakt, że praca doktorska jest bardzo często źródłem wiedzy dla studentów i młodszych doktorantów uważam, że Pani mgr Marta Radomska powinna przygotować i dołączyć do pracy erratę do Rozdziału 7.

Poza tym praca spełnia wymogi stawiane zwyczajowo i formalnie rozprawom doktorskim, określone ustawą o tytule i stopniach naukowych wraz ze wszystkimi uzupełnieniami i dlatego wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Marty Radomskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Magdalena Skompska

