Uniwersytet ŁÓDZKI

WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Prof. nadzw. dr hab. Sławomira Skrzypek
Zakład Elektroanalizy i Elektrochemii
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Wydział Chemii UŁ,
Łódź, ul. Tamka 12
e-mail: skrzypek@uni.lodz.pl

Łódź, 27.10.2016

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Radomskiej

pt. „Projektowanie i charakterystyka fizykochemiczna hybrydowych układów do utleniania glukozy"

Praca doktorska magister Marty Radomskiej została zrealizowana w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Kuleszy. Recenzowana rozprawa dotyczy badań mających na celu otrzymanie biosensorów elektrochemicznych glukozy opartych na zintegrowanych układach kompozytowych z mediatorem i w procesie bezpośredniego przeniesienia elektronu.

Poszukiwanie i opracowanie efektywnie działającego układu z wykorzystaniem biokatalizatora oraz odpowiedniego mediatora do utleniania glukozy jest ważnym zagadnieniem w technologii ogniw paliwowych i bioczujników. Potencjalnym zastosowaniem bioogniw paliwowych może być zasilanie implantowanych urządzeń biomedycznych, spośród wielu dostępnych paliw glukoza jest najczęściej wykorzystywana ze względu na ogólną dostępność oraz obecność we krwi. Z tego punktu widzenia, tematyka podjętej pracy doktorskiej jest bardzo aktualna i ważna, dobrze wpisuje się w trendy światowych badań. Świadczy o tym chociażby rosnąca z roku na rok liczba artykułów naukowych poświęconych tej tematyce. Nie dziwi więc fakt, że tą tematyką zainteresowała się również Doktorantka.

Rozprawa doktorska magister Marty Radomskiej została przedstawiona w formie oprawionego maszynopisu obejmującego 156 stron, rozpoczyna ją spis treści, a kończy spis literaturowy zawierający 197 pozycji. Bardzo użyteczny jest dodany na końcu pracy wykaz używanych skrótów. Struktura pracy jest tradycyjna i składa się z dwóch części: teoretycznej i doświadczalnej. W części pierwszej, po wstępie, następuje wprowadzenie literaturowe przedstawione na 54 stronach.

Część literaturowa jest ściśle związana z tematyką prowadzonych badań eksperymentalnych i stanowi swego rodzaju kompendium na temat biosensora glukozy. Na początku Doktorantka opisuje bioogniwa paliwowe z uwzględnieniem podziału na mikobiologiczne ogniwa paliwowe i enzymatyczne ogniwa paliwowe. W tym rozdziale przedstawia też wykorzystanie modelowego enzymu - oksydazy glukozowej do utleniania glukozy. Enzym ten będzie wykorzystywany przez mgr Radomską w części eksperymentalnej. Z tego też powodu Autorka wchodzi w zagadnienia elektrochemiczne dotyczące procesu przeniesienia elektronu między enzymem a powierzchnią elektrody. Za cenne uważam zwrócenie uwagi na implantowane enzymatyczne bioogniwa paliwowe, pokazujące głęboki sens podejmowanych badań. Przedmiotem opisu są także sensory na bazie elementu biologicznego z uwzględnieniem biosensorów do oznaczania glukozy. Ze względu na fakt wykorzystywania w swojej pracy nanorurek węglowych, w części teoretycznej przedstawione są metody ich wytwarzania, właściwości fizykochemiczne, a przede wszystkim zastosowanie nanorurek węglowych w bioelektrokatalizie. Wykorzystanie nanorurek węglowych oraz innych nanomateriałów do konstrukcji elektrod enzymatycznych stało się popularne. Ważne miejsce w pracy zajmuje także przedstawienie informacji na temat poli(3,4-etylenodioksytiofenu) (PEDOT), polimeru będącego składnikiem wytwarzanych przez Doktorantkę warstw. Ponadto zostały także opisane podstawy teoretyczne metod elektrochemicznych, w tym woltamperometrycznych, chronoamperometrycznych, chronokulometrycznych jak i podstawy w obrazowaniu TEM (transmisyjnym elektroskopem elektronowym), SEM (skaningowym mikroskopem elektronowym), AFM (mikroskopem sił atomowych) oraz FTIR (spektroskopii w poczerwieni z transformacją Fouriera).

Podsumowując część literaturową można stwierdzić, że podane informacje są bardzo przydatne, umiejętnie przybliżają czytelnikowi problematykę rozprawy doktorskiej i stanowią

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
ul.Tamka 12, 91-403 Łódź, tel. (+48) (42) 635-58-04, fax (+48) (42) 635-57-96
http://www.chemia.uni.lodz.pl, e-mail: chemogin@chemia.uni.lodz.pl
Kierownik Katedry: dr hab. Sławomira Skrzypek
tel. (+48) (42) 635-57-85, e-mail: skrzypek@uni.lodz.pl

dobre wprowadzenie do jej części eksperymentalnej. Odpowiednio zebrana bibliografia dowodzi dobrej znajomości przedmiotu badań. Nie mam również zastrzeżeń do logiki i sposobu narracji wprowadzenia do rozprawy. Redakcja pracy jest bardzo staranna, na uwagę zasługują poglądowe rysunki w kolorze.

Część doświadczalna pracy została zawarta w rozdziałach (z podrozdziałami), dotyczących bioelektrokatalitycznego utleniania glukozy na zintegrowanych układach kompozytowych z mediatorem (rozdział 7) i w procesie bezpośredniego przeniesienia elektronu (rozdział 8), logicznie nawiązując do podziału przedstawionego w części literaturowej. Tematyka pracy eksperymentalnej obejmuje opis przygotowania, szeroką charakterystykę fizykochemiczną, a także ocenę przydatności analitycznej układów kompozytowych z trwale unieruchomioną oksydazą glukozową (GOx).

Badania eksperymentalne Autorka rozpoczęła od wykorzystania siarczanu N-metylofenazyny (NMP) jako mediatora redoks w procesie utleniania glukozy w układzie złożonym z modyfikowanych kwasem 4-pirol-1-yl-benzoesowym nanorurek węglowych (CNT/PyBA) i oksydazy glukozowej na elektrodzie z węgla szklistego. Doktorantka po kolejnych nałożeniach (nakropleniach, elektropolimeryzacji) warstw przeprowadzała ich charakterystykę elektrochemiczną (woltamperometria cykliczna), mikroskopową, a także badała trwałość uzyskanych warstw. Na kolejnych etapach budowy sensora Doktorantka także wykonywała charakterystykę elektrochemiczną (woltamperometria cykliczna), mikroskopową uzyskanych warstw, badała ich trwałość. Podrozdziały pracy świadczą o rzetelnym podejściu mgr Rutkowskiej do eksperymentu. Doktorantka stwierdziła, że w przypadku wyżej wymienionego mediatora ważna jest kolejność położenia komponentów i zdiagnozowała, że np. hybrydowy układ w procesie utleniania glukozy CNT/PyBA_GOx_NMP jest lepszy niż CNT/PyBA_NMP_GOx. Nie bez znaczenia było również końcowe zastosowanie Nafionu. Aby określić dynamikę transportu ładunku w układach wykorzystała technikę chronokulometryczną, zaś aby zbadać kinetykę elektrokatalitycznego utleniania glukozy dla w/w układu złożonego zastosowała chronoamperometrię.

Analogiczny komplet badań Autorka przeprowadziła w stosunku do zaprojektowanego układu wykorzystującego w matrycy polimer przewodzący PEDOT z nanorurkami węglowymi

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
ul.Tamka 12, 91-403 Łódź, tel. (+48) (42) 635-58-04, fax (+48) (42) 635-57-96
http://www.chemia.uni.lodz.pl, e-mail: chemogin@chemia.uni.lodz.pl
Kierownik Katedry: dr hab. Sławomira Skrzypek
tel. (+48) (42) 635-57-85, e-mail: skrzypek@uni.lodz.pl

modyfikowanymi jak poprzednio kwasem 4-pirol-1-yl-benzoesowym. Doktorantka dowiodła, że wprowadzenie PEDOT-u do warstwy hybrydowej powoduje wzrost mechanicznej trwałości oraz polepszenie dystrybucji ładunku w obrębie układu bioelektrokatalitycznego. Domieszkowanie w/w nanorurkami węglowymi poprawia porowatość matrycy i potencjalnie może zapobiegać desorpcji katalizatora z układu. Doktorantka uzyskała potwierdzające wyniki wykorzystując matrycę CNT/PyBA/PEDOT w zintegrowanym układzie z nakraplanymi raz jeszcze modyfikowanymi nanorurkami weglowymi, mediatorem tetratiafulwalenem (TTF) oraz biokatalizatorem – oksydazą glukozową. Zauważyła, że w takim układzie poprawia się ogólna aktywność katalityczna elektroutleniania glukozy, a także następuje stabilizacja całego układu.

Ponadto mgr Radomska zaprojektowała i przygotowała zintegrowany układ kompozytowy do bioelektrokatalitycznego utleniania glukozy w procesie bezpośredniego przeniesienia elektronu z centrum aktywnego enzymu do powierzchni elektrody. Tym razem wykorzystała niemodyfikowane nanorurki węglowe i elektroosadzone nanocząstki palladu i tlenku palladu na elektrodzie z węgla szklistego. Przeprowadziła charakterystykę woltamperometyczna i mikroskopową uzyskanej warstwy CNT_Pd/PdO_GOx, oznaczyła glukozę na warstwie traktując ją jako biosensor III generacji. Moim zdaniem, uzyskane wyniki liniowego zakresu stężeń – mimo wysokich wartości stężeń są interesujące.

Podsumowując przedstawiony do oceny dorobek doświadczalny chciałabym jeszcze raz podkreślić, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania wymagały bardzo specjalistycznej i szerokiej wiedzy oraz zastosowania różnych metod pomiarowych (woltamperometria. chronoamperometria, chronokulometria, transmisyjna elektroskopia elektronowa, skaningowa mikroskopia elektronowa, mikroskopia sił atomowych spektroskopia w poczerwieni z transformacją Fouriera). Świadczy to o bardzo dobrych podstawach naukowych, wszechstronności i nowoczesnym podejściu Doktorantki do postawionego problemu naukowego. Doktorantce udało się zrealizować zamierzony cel - zaprojektowanie, przygotowanie i scharakteryzowanie efektywnie działającego układu biokatalitycznego - i zakończyć swoją pracę niewątpliwymi osiągnięciami.

Z obowiązku recenzenta muszę jednak zauważyć, że Autorka prezentując swoje badania w części doświadczalnej nie ustrzegła się pewnych drobnych niedociągnięć,

po przeczytaniu pracy pojawia się kilka pytań odnośnie sposobu prezentacji czy dyskusji wyników, które mogą być z pewnością wyjaśnione w trakcie publicznej obrony:

1) Rys.29 i 30 (str 70 i 71) przedstawiają woltamperogramy cykliczne elektrochemicznej polimeryzacji mediatora siarczanu N-metylofenazyny. Z jakim mechanizmem elektrodowym związane są rejestrowane sygnały? Mówiąc o różnicy potencjałów pomiędzy pikiem utlenienia i redukcji ΔE dobrze byłoby podać elektronowość zachodzącego procesu redox.

   Także w przypadkach innych woltamperogramów cyklicznych zarejestrowanych w buforze fosforanowym o pH 7.0 na modyfikowanych elektrodach (np. Rys. 65 czy 92) dobrze byłoby zasugerować, od czego pochodzą przedstawiane sygnały.

2) Badanie trwałości warstwy NMP (str 72) – cenniejsze byłoby określenie, przez jaki czas elektroda zachowuje stały sygnał z określoną dokładnością (np. ± 5%). Podobnie jest z badaniem trwałości kolejnych warstw. Przy porównywaniu pików woltamperometrycznych, można użyć parametrów ilościowych, np. podać wartości prądów lub ładunku dla danych pików i określić w % o ile zmalał prąd lub ładunek po określonym czasie. Ułatwiłoby to porównywanie sygnałów rejestrowanych po kolejnych etapach. Ponadto, moim zdaniem wyjaśniając obniżenie sygnału przy badaniu trwałości warstwy (str. 78) trafniej byłoby pisać o „degradacji polimeru" niż o „wyciekaniu mediatora".

3) W rozdziale 7.2.4.2 „Bioelektrokatalityczne utlenianiu glukozy na warstwie CNT/PyBA_GOx_NMP", na str 92 pojawia się określenie „segmenty". Czy jest to nazwa cykli w woltamoperometrii cyklicznej?

   W tym samym rozdziale, na str.94 Doktorantka przytacza wyznaczoną stałą Michaelisa-Menten równą 20 mM pisząc, że układ odznacza się wysokim powinowactwem do glukozy. Równocześnie na str. 40 w części teoretycznej stała Michaelisa-Menten równa 2.7 nM także świadczy o dobrej aktywności bioelektrokatalitycznej unieruchomionej oksydazy glukozy. Jaki rząd wielkości tej stałej świadczy, więc o dobrej aktywności czujnika względem glukozy?

4) Na Rys. 59 (str 97) Autorka przedstawia zmiany sygnału woltamperometrycznego glukozy na zmodyfikowanej elektrodzie CNT/PyBA_GOx_NMP po 30 i 60 dniach.

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
ul.Tamka 12, 91-403 Łódź, tel. (+48) (42) 635-58-04, fax (+48) (42) 635-57-96
http://www.chemia.uni.lodz.pl, e-mail: chemogin@chemia.uni.lodz.pl
Kierownik Katedry: dr hab. Sławomira Skrzypek
tel. (+48) (42) 635-57-85, e-mail: skrzypek@uni.lodz.pl

Czy badano zmiany sygnału po jednym czy kilku dniach? Czy wiadomo jak długo sygnał był stały?

5) Rys.62 (str.100), przedstawia obrazowania modyfikowanej elektrody z węgla szklistego wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Szkoda, że nie podano danych dotyczących parametru R_q czy przekrojów powierzchni. Dostarczyłyby one bardziej konkretnych informacji o porowatości czy ziarnistości badanych struktur.
6) W Paragrafie 7.3.1 (na str 101) przedstawione są widma spektroskopowe FTIR potwierdzające obecność bazowego polimeru PEDOT w kompozycie CNT/PyBA/PEDOT. Moim zdaniem, w tym wypadku ważniejsze byłoby wykazanie obecności nanorurek weglowych modyfikowanych kwasem 4-pirol-1-yl-benzoesowym.
7) Czy Autorka dokonała oceny statystycznej (nachylenie prostej, wyraz wolny, RSD, R^2) wyników zależności gęstości prądowej od stężenia glukozy? Krzywe kalibracyjne (Rys.105 czy 110) przedstawiające te zależności nie posiadają np. słupków błędów.
8) Doktorantka w trakcie badań stwierdziła, że w procesie bioelektrokatalitycznego utleniania glukozy lepsze wyniki uzyskuje się na warstwie CNT/PyBA_GOx_NMP niż CNT/PyBA_NMP_GOx. Przechodząc do badań z tetratiafulwalenem Autorka zbadała tylko warstwę CNT/PyBA/PEDOT_CNT/PyBA_TTF_GOx. Dlaczego nie przeprowadziła badań warstwy CNT/PyBA/PEDOT_CNT/PyBA_GOx_TTF? Ponadto brak jest charakterystyki warstwy CNT/PyBA/PEDOT_CNT/PyBA_TTF

Drobne niedociągnięcia

Str. 29 – skróty PQQ i GDH, brak ich w spisie na str. 145

Str. 39, 40 – autorka używa wyrażeń „limit detekcji", zamiast „granica wykrywalności"

Str. 66 – „do badania wykorzystywano tipy o grubości..", wykorzystano raczej sondy AFM, w opisie techniki AFM powinno być podane w jakim trybie wykonywano obrazowanie.

Str. 70 – wyrażenie „elektrodę cyklizowano" na określenie cyklicznego przemiatania potencjałem jest swoistym żargonem.

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
ul.Tamka 12, 91-403 Łódź, tel. (+48) (42) 635-58-04, fax (+48) (42) 635-57-96
http://www.chemia.uni.lodz.pl, e-mail: chemogin@chemia.uni.lodz.pl
Kierownik Katedry: dr hab. Sławomira Skrzypek
tel. (+48) (42) 635-57-85, e-mail: skrzypek@uni.lodz.pl

Str 85 – Autorka pisząc o bioelektrokatalitycznym utlenianiu glukozy na warstwie CNT/PyBA_GOx_NMP zauważa „całkowity zanik prądu katodowego". Moim zdaniem prąd katodowy jest rejestrowany, brak jest ukształtowanego piku katodowego. Str 103 zdanie „Różnica pomiędzy potencjałami pików utlenienia i redukcji wynosi 65 mV. Wartość ta jest bliska wartości zerowej, świadczącej o odwracalności procesów redoks typu powierzchniowego" jest niejasne (trudno jest uznać 65mV różnicy potencjałów jako wartość bliską zeru).

Mimo poczynionych uwag, które oczywiście mają charakter dyskusyjny, pracę oceniam pozytywnie, a mgr Marta Radomska dała się poznać, jako doświadczony eksperymentator, umiejący wybrać odpowiednią metodę badawczą, zaprojektować doświadczenie i wyciągnąć z otrzymanych rezultatów prawidłowe wnioski. Należy podkreślić, że recenzowana praca wnosi nowe elementy do prężnie rozwijającego się działu nauki, jakim są układy biokatalityczne do utleniania glukozy.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa zatytułowana „Projektowanie i charakterystyka fizykochemiczna hybrydowych układów do utleniania glukozy" spełnia wymagania merytoryczne i formalne Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym stawiane pracom doktorskim. Wnioskuję o dopuszczenie mgr. Marty Radomskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Sławomira Skrzypek

www.chemia.uni.lodz.pl

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
ul.Tamka 12, 91-403 Łódź, tel. (+48) (42) 635-58-04, fax (+48) (42) 635-57-96
http://www.chemia.uni.lodz.pl, e-mail: chemogin@chemia.uni.lodz.pl
Kierownik Katedry: dr hab. Sławomira Skrzypek
tel. (+48) (42) 635-57-85, e-mail: skrzypek@uni.lodz.pl