



AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

Prof. dr hab. Andrzej Bobrowski

e-mail: abobrow@agh.edu.pl

Kraków, 10.09.2018

Reviewer's Report On a Thesis Entitled "New materials for immobilization of redox enzymes on electrodes for application in biofuel cells" submitted by Ms. Valentina Grippo for the Degree of Doctor of Philosophy, prepared under the supervision of Professor Renata Bilewicz.

Intensive research on the design of miniaturized biofuel cells used as low-output power sources, with intended applications that include sensors or medical implants, has been on-going. This type of cells is fuelled using natural substances such as oxygen or glucose, and utilizes bioactive catalysts, including micro-organisms or redox enzymes, for the construction of electrode materials instead of using costly platinum or palladium catalysts. Biofuel cells should provide sufficient power output as well as exhibit good stability and chemical resistance, and, in the case of medical applications, should also ensure biocompatibility and durability. The main issue concerning the fabrication of biofuel cells that meet the aforementioned conditions is therefore the choice of the appropriate catalyst (enzyme) and the selection of the electrode materials that increase the working surface area of the electrode and provide direct contact with the active sites of the enzyme.

The team headed by Professor Renata Bilewicz, the supervisor of the evaluated thesis, has extensive experience and notable achievements related to the construction of new enzyme-based biofuel cells, especially with regard to the selection of optimal enzymatic catalysts and various molecular matrices used to bind the enzymes to the electrodes. The presented PhD thesis is a continuation of this important and interesting subject.

The objective of the dissertation was to investigate the catalytic and electrochemical properties of electrodes obtained by immobilizing three types of enzymes either via adsorption on carbon nanotubes or using the liquid crystalline lipid mesophase. Its suitability for the construction of a new type of enzymatic biofuel cells was to be evaluated subsequently.

Important aspects of the electrochemical applications of enzymes in biosensors and biofuel cells, such as their electrochemical and catalytic properties, the methods of their immobilization on solid substrates and the mechanism of electron transfer between the enzyme and the electrode are presented in condensed form in the literature review. In this part, the author also describes the principles of voltammetric techniques that are most commonly used to study adsorptive and catalytic processes in which enzymes participate. The optical technique known as small angle X-ray scattering (SAXS) and applied for cubic phase characterization is presented as well. The last chapter in the literature section concerns the design and principle of operation of biofuel cells and their electrical parameters.

The well-structured and planned literature part refers to 171 items, and provides valuable context for the remaining sections. The author has demonstrated very good knowledge of the literature of the subject. The entire section is well-written and easy to comprehend, and it constitutes a good introduction.

The experimental section of the dissertation starts with a detailed and comprehensive description of the applied apparatus, the electrode and bioelectrode preparation procedure, and the construction of the cells and biofuel cells used in the study. The proper preparation of the materials for electrochemical investigations and their synthesis and purification was a major effort and required broad knowledge and considerable skill from the author. It is therefore a particularly valuable part of the dissertation.

The bioanodes and biocathodes that were prepared were obtained in one of two ways. In the first method, the electrodes were modified with redox enzymes adsorbed on the electrode nanostructures with carbon nanotubes, including multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and Naphthyl-functionalized MWCNTs (NaphthMWCNTs). The second approach involved the immobilization of the enzymes in the liquid crystalline lipid mesophase. The most frequently applied substrate for these modifications was the glassy carbon electrode. In a certain number of experiments, gold nanoparticles and graphene were applied to modify the electrode surface.

Bilirubin oxidase obtained from *Myrothecium verrucaria* (MvBOD) was used as a biocatalyst of oxygen electroreduction, while cellobiose dehydrogenase (CtCDH) from

Corynascus thermophilus and fructose dehydrogenase from Gluconobacter (FDH) were applied as bioanode materials. The enzyme-catalysts were not the only compounds that were deposited in the liquid crystalline lipid mesophase or on the carbon nanotubes; mediators such as 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) or hexaamminerthenium(II) chloride ($[\text{Rh}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) were also deposited at these sites, and participated in the catalytic oxidation of lactose and in the process of electron transfer to the electrode surface.

The subsequent sections of the dissertation concerned the influence of the substrate modification procedure on the electrochemical and catalytic properties of the obtained bioanodes and biocathodes. The application of cyclic voltammetry as the main tool made it possible to evaluate and compare the stability and catalytic activity of the enzymes adsorbed on carbon nanotubes or immobilized in the liquid mesophase.

A significant part of the experimental section was dedicated to the construction of biofuel cells utilizing the previously examined enzymatic reactions and the optimal electrode modification procedures. Parameters such as open cell voltage, power output, current density, stability and durability were determined for the following systems:

- hybrid biofuel cell with a zinc disc covered with hopeite as the anode and naphthylated multiwall carbon nanotubes with bound bilirubin oxidase (NaphthMWCNTs/MyBOD) as the cathode
- fully biological NaphthMWCNTs/MyBOD//MWCNTs/FDE fuel cell
- fully biological NaphthMWCNTs/MyBOD//MWCNTs/CtCDH fuel cell.

It was also demonstrated that in the case of NaphthMWCNTs/MyBOD//MWCNTs/CtCDH, for which the CtCDH enzyme had been immobilized in the liquid mesophase, power density and open cell voltage were significantly higher.

In the final part of the experimental section, similar bioanode and biocathode combinations were designed and investigated under solution flow conditions. The advantages of using the cubic phase for entrapping the enzymes were demonstrated.

The experimental part was not limited to the preparation of the materials and electrochemical investigations. The cubic phases with incorporated enzymes were also examined using small angle X-ray scattering (SAXS). To meet the objectives of the study, the author had to show the ability to apply various research techniques as well as great knowledge on the catalytic activity of enzymes and the preparation of bioelectrodes and biofuel cells. The evaluated PhD thesis is characterized by high scientific merit and considerable novelty. The author demonstrated valid reasoning when interpreting the observed phenomena and the

collected experimental data. The results of her research have already been published in the form of two papers in high-quality journals such as Bioelectrochemistry and Electroanalysis.

I have only several critical remarks:

- Abbreviations are used too often in place of full names, especially with regard to rarely used terms, e.g. DET for direct electron transfer, IET for internal electron transfer, MET for mediated electron transfer, ORR for dioxygen reduction reaction, and LB for Langmuir-Blodgett. This makes the text slightly more difficult to follow. Although abbreviations are commonly used in publications, it is worth considering including the list of applied abbreviations and acronyms in the form of a separate bookmark.
- Not all figures are referred to in the main body of the text. Examples of such figures include Figs 20, 26, 41 and 43. In addition, "Figure 51" should in fact be "Figure 50" (page 92).
- "Electrodes" (page 43) should actually be "electrons".
- The formula of ruthenium (title of section 5.3.2.3) and the sentence on page 99 (rows 5-7) are incomplete.
- A text fragment is repeated on pages 65-66.
- Figure 20 should be discussed more broadly.

The above-mentioned errors are not significant and they do not impede the comprehension of the dissertation.

In conclusion, the dissertation deals with topics that are current and relevant from both the scientific and the practical points of view. A part of the study has already been published, and I expect that the remainder will be published soon. The author has demonstrated the ability to work in larger research groups with participants from different countries as well as extensive knowledge on the literature of the subject. The thesis is generally well-structured and clearly written, and the figures and diagrams were carefully prepared.

The dissertation under review meets the requirements set by the corresponding act, and my overall evaluation is therefore highly positive. It is my pleasure to recommend the candidate for the degree of Doctor of Philosophy.



Andrzej Bobrowski

Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Prof. dr hab. Andrzej Bobrowski
e-mail: abobrow@agh.edu.pl

Kraków, 10.09.2018

Raport recenzenta na temat pracy doktorskiej pod tytułem „Nowe materiały do immobilizacji enzymów redoks na elektrodach do zastosowania w ogniwach biopaliwowych”, którą przedstawiła Pani Valentina Grippo, na stopień doktora, przygotowana pod kierunkiem profesor Renaty Bilewicz.

Trwają intensywne badania nad projektowaniem zminiaturyzowanych ogniw biopaliwowych wykorzystywanych jako źródła o małej mocy wyjściowej, z przeznaczeniem obejmującym czujniki lub implanty medyczne. Ten typ ogniw jest zasilany przy użyciu naturalnych substancji, takich jak tlen lub glukoza, i wykorzystuje bioaktywne katalizatory, w tym mikroorganizmy lub enzymy redoks, do budowy materiałów elektrodowych zamiast stosowania kosztownych katalizatorów platynowych lub palladowych. Ogniwa biopaliwowe powinny zapewniać wystarczającą moc wyjściową, jak również wykazywać dobrą stabilność i odporność chemiczną, a w przypadku zastosowań medycznych powinny również zapewniać biokompatybilność i trwałość. Głównym problemem związanym z wytwarzaniem ogniw biopaliwowych spełniających powyższe warunki jest zatem wybór odpowiedniego katalizatora (enzymu) i dobór materiałów elektrodowych, które zwiększają powierzchnię roboczą elektrody i zapewniają bezpośredni kontakt z miejscami aktywnymi enzymu.

Zespół kierowany przez profesor Renatę Bilewicz, opiekuna ocenianej pracy doktorskiej, ma szerokie doświadczenie i znaczące osiągnięcia w budowie nowych opartych na enzymach ogniw biopaliwowych, zwłaszcza w zakresie doboru optymalnych katalizatorów enzymatycznych i różnych matryc molekularnych stosowanych do wiązania enzymów z elektrodami. Prezentowana praca doktorska jest kontynuacją tego ważnego i interesującego tematu.



Celem rozprawy było zbadanie właściwości katalitycznych i elektrochemicznych elektrod uzyskanych przez unieruchomienie trzech rodzajów enzymów przez adsorpcję na nanorurkach węglowych lub przez zastosowanie ciekłokrystalicznej mezofazy lipidowej. Następnie miała zostać oceniona jej przydatność do budowy nowego typu enzymatycznych ogniw biopaliwowych.

Istotne aspekty zastosowań elektrochemicznych enzymów w biosensorach i ogniwach biopaliwowych, takie jak ich właściwości elektrochemiczne i katalityczne, metody ich unieruchamiania na stałych podłożach i mechanizm przenoszenia elektronów między enzymem a elektrodą przedstawiono w skróconej formie w przeglądzie literatury. W tej części autorka opisuje również zasady technik woltamperometrycznych, które są najczęściej stosowane do badania procesów adsorpcyjnych i katalitycznych, w których biorą udział enzymy. Przedstawiono również technikę optyczną znaną jako małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego SAXS (ang. *Small Angle X-Ray Scattering*) i zastosowaną do charakterystyki fazy kubicznej. Ostatni rozdział w sekcji literaturowej dotyczy projektu i zasady działania ogniw biopaliwowych oraz ich parametrów elektrycznych.

Dobrze ustrukturyzowana i zaplanowana część literaturowa zawiera odniesienia do 171 pozycji i stanowi cenny kontekst dla pozostałych sekcji. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu. Cała sekcja jest dobrze napisana, łatwa do zrozumienia i stanowi dobre wprowadzenie.

Sekcja eksperymentalna rozprawy rozpoczyna się od szczegółowego i wyczerpującego opisu zastosowanej aparatury, procedury przygotowania elektrody i bioelektrody oraz konstrukcji ogniw i ogniw biopaliwowych użytych w badaniu. Prawidłowe przygotowanie materiałów do badań elektrochemicznych oraz ich synteza i oczyszczenie stanowiło duży wysiłek i wymagało od autorki rozległej wiedzy i znacznych umiejętności. Zatem jest to szczególnie cenna część rozprawy.

Przygotowane bioanody i biokatody otrzymano jednym z dwóch sposobów. W pierwszej metodzie modyfikowano elektrody za pomocą enzymów redoks zaadsorbowanych na nanostrukturach elektrody z nanorurkami węglowymi, w tym wielościennymi nanorurkami węglowymi (MWCNT), nanorurkami węglowymi o pojedynczej ściance (SWCNT) i nanorurkami MWCNT z funkcyjnymi grupami naftylowymi (NaphthMWCNT). Druga metoda polegała na unieruchomieniu enzymów w ciekłokrystalicznej mezofazie lipidowej. Najczęściej stosowanym podłożem dla tych modyfikacji była szklana elektroda węglowa. W pewnej liczbie eksperymentów zastosowano nanocząstki złota i grafen w celu zmodyfikowania powierzchni elektrody.

Oksydaza bilirubiny uzyskana z *Myrothecium verrucaria* (MvBOD) została użyta jako biokatalizator elektroredukcji tlenu, natomiast dehydrogenaza celobiozy (CtCDH) uzyskana z



Corynascus thermophilus i dehydrogenaza fruktozy uzyskana z Gluconobacter (FDH) zostały zastosowane jako materiały bioanody. Katalizatory enzymatyczne nie były jedynymi związkami osadzonymi w ciekłokrystalicznej mezofazie lipidowej lub na nanorurkach węglowych; mediatory takie jak 2,6-dichlorofenolindofenol (DCPIP) lub chlorek heksaaminorutenu (II) ($[\text{Rh}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) również zostały osadzone w tych miejscach i uczestniczyły w katalitycznym utlenianiu laktozy oraz w procesie przenoszenia elektronów do powierzchni elektrody.

Kolejne sekcje rozprawy dotyczyły wpływu procedury modyfikacji podłoża na właściwości elektrochemiczne i katalityczne otrzymanych bioanod i biokatod. Zastosowanie woltamperometrii cyklicznej jako głównego narzędzia umożliwiło ocenę i porównanie stabilności i aktywności katalitycznej enzymów zaadsorbowanych na nanorurkach węglowych lub unieruchomionych w ciekłej mezofazie.

Znaczna część sekcji eksperymentalnej poświęcona była budowie ogniw biopaliwowych wykorzystujących uprzednio zbadane reakcje enzymatyczne i optymalne procedury modyfikacji elektrod. Parametry takie jak napięcie otwartego obwodu, moc wyjściowa, gęstość prądu, stabilność i trwałość zostały określone dla następujących układów:

- hybrydowe ogniwo biopaliwowe z dyskiem cynkowym pokrytym hopeitem jako anodą i naftyłowymi wielościennymi nanorurkami węglowymi ze związaną oksydazą bilirubiny (NaphthMWCNT/MyBOD) jako katodą
- w pełni biologiczne ogniwo paliwowe NaphthMWCNT/MyBOD//MWCNT/FDE
- w pełni biologiczne ogniwo paliwowe NaphthMWCNT/MyBOD//MWCNT/CtCDH.

Wykazano również, że w przypadku ogniwa NaphthMWCNT/MyBOD//MWCNT/CtCDH, w przypadku którego enzym CtCDH został unieruchomiony w ciekłej mezofazie, gęstość mocy i napięcie otwartego obwodu były znacznie wyższe.

W końcowej części sekcji eksperymentalnej zaprojektowano i zbadano podobne kombinacje bioanod i biokatod w warunkach przepływu roztworu. Wykazano zalety stosowania fazy kubicznej do uwięzienia enzymów.

Część eksperymentalna nie została ograniczona do przygotowania materiałów i badań elektrochemicznych. Fazy kubiczne z wbudowanymi enzymami badano również przy użyciu metody małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego SAXS. Aby sprostać celom badania, autorka musiała wykazać się umiejętnością stosowania różnych technik badawczych, a także doskonałą wiedzą na temat aktywności katalitycznej enzymów oraz przygotowania bioelektrod i ogniw biopaliwowych. Oceniana praca doktorska charakteryzuje się wysoką wartością naukową i znacznym nowatorstwem. Autorka przedstawiła słuszną argumentację w trakcie interpretacji zaobserwowanych zjawisk i



zgromadzonych danych eksperymentalnych. Wyniki jej badań zostały już opublikowane w formie dwóch artykułów w uznanych czasopismach, takich jak Bioelectrochemistry oraz Electroanalysis. Mam tylko kilka uwag krytycznych:

- Skróty są używane zbyt często zamiast pełnych nazw, szczególnie w odniesieniu do rzadko używanych terminów, np. DET - bezpośredni transfer elektronów, IET - wewnętrzny transfer elektronów, MET - transfer elektronów z udziałem mediatora, ORR - reakcja redukcji tlenu i LB - technika Langmuira-Blodgetta. To sprawia, że tekst jest nieco trudniejszy do czytania. Chociaż skróty są powszechnie używane w publikacjach, warto rozważyć umieszczenie listy zastosowanych skrótów i akronimów w postaci oddzielnej zakładki.
- Do niektórych rysunków nie ma odniesień w głównej części tekstu. Przykłady takich rysunków obejmują rys. 20, 26, 41 i 43. Ponadto „Rysunek 51” powinien być określony jako „Rysunek 50” (strona 92).
- „Elektrody” (strona 43) powinny być określone jako „elektrody”.
- Wzór rutenu (tytuł sekcji 5.3.2.3) i zdanie na stronie 99 (wiersze 5-7) są niekompletne.
- Fragment tekstu jest powtórzony na stronach 65-66.
- Rysunek 20 powinien zostać omówiony szerzej.

Powyższe błędy nie są znaczące i nie przeszkadzają w zrozumieniu rozprawy.

Podsumowując, rozprawa dotyczy tematów, które są aktualne i istotne zarówno z naukowego, jak i praktycznego punktu widzenia. Część badań została już opublikowana i spodziewam się, że pozostała część zostanie opublikowana wkrótce. Autorka wykazała się umiejętnością pracy w większych grupach badawczych z uczestnikami z różnych krajów, a także rozległą wiedzą na temat literatury przedmiotu. Teza jest zasadniczo dobrze skonstruowana i napisana w zrozumiałym sposobie, a rysunki i schematy zostały starannie przygotowane.

Rozpatrywana rozprawa spełnia wymagania określone przez odpowiedni akt, zatem moja ogólna ocena jest bardzo pozytywna. Z przyjemnością rekomenduję kandydatkę na stopień doktora.

(nieczytelny podpis)

Andrzej Bobrowski

Niniejszym potwierdzam zgodność powyższego tłumaczenia z przedłożoną mi w dniu 20 września 2018 roku kopią dokumentu w języku angielskim, przesłaną pocztą elektroniczną.



Tłumacz przysięgły języka angielskiego
Mgr Maciej Kowasz
Nr uprawnień TP/2604/05
Dnia: 20 września 2018 roku