



dr hab. inż. Mariusz Pietrzak  
Katedra Biotechnologii Medycznej

Warszawa, 30 września 2018r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Valentiny Grippo

pt: „*New materials for immobilization of redox enzymes on electrodes for application in biofuel cells*”

Badania do przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Valentiny Grippo pt: „*New materials for immobilization of redox enzymes on electrodes for application in biofuel cells*” wykonane zostały w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrood na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Funkcję promotora tej pracy pełni Pani prof. dr hab. Renata Bilewicz.

Zastosowanie katalizatorów pochodzenia naturalnego, w tym przede wszystkim enzymów, związane jest nierozdzielnie z rozwojem biotechnologii przemysłowej. Należy podkreślić, że od ponad pięćdziesięciu lat możemy również zaobserwować nieustający „romans” enzymów z elektrochemią, czy to w kontekście konstrukcji biocujników czy też bioogniw. Z uwagi na bardzo szybki wzrost zużycia energii na świecie w wyniku rozwoju technologicznego i gospodarczego, a także coraz większą świadomość ekologiczną obserwuje się coraz szersze zainteresowanie „czystymi”, w tym elektrochemicznymi czy też bioelektrochemicznymi źródłami energii, które mogą wykorzystywać jako paliwo m.in. odpady przemysłu przetwórczego, w tym przede wszystkim spożywczego. W kontekście biocujników elektrochemicznych oraz bioogniw paliwowych szczególna uwaga skupiona jest na takiej konstrukcji elektrod oraz wyborze takich enzymów by możliwe było bezpośrednie przeniesienie elektronu z enzymu na elektrodę lub odwrotnie. Równocześnie, niewątpliwie istotnym zagadnieniem, nierozłącznie związanym z zastosowaniem enzymów w bioelektrokatalizie jest ich skuteczne unieruchomienie na powierzchni elektrod, w taki sposób, aby zachować ich strukturę i co najważniejsze, i w dużej mierze ze struktury wynikające, wysoką aktywność katalityczną. Śledząc literaturę naukową można zauważyć nieustające zainteresowanie badaczy nowymi metodami immobilizacji enzymów, które zapewnić mają ich coraz dłuższe oraz skuteczne funkcjonowanie, a w kontekście bioogniw paliwowych jak największą moc. Przedłożona mi do recenzji praca doktorska dotyczy badań nad wykorzystaniem trzech enzymów z klasy

oksydoreduktaz tj. dehydrogenazy celobiozowej (CDH), dehydrogenazy fruktozowej (FDH) oraz oksydazy bilirubinowej (BOD) w konstrukcji elektrod bioogniwa paliwowego z zastosowaniem różnych metod immobilizacji, w tym wykorzystując fazy kubiczne oraz różnie modyfikowane nanorurki węglowe, co należy podkreślić, znakomicie wpisuje się w aktualne trendy badawcze.

### *Ocena układu, języka oraz opracowania redakcyjnego rozprawy*

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma klasyczny układ i składa się ze 130 stron tekstu wzbogaconego o 60 rysunków i schematów oraz 6 tabel. Rozpoczyna się ona klarownym przedstawieniem celu pracy oraz krótkim wprowadzeniem w tematykę podejmowanych badań, po czym następuje część literaturowa. Część literaturowa przedstawia czytelnikowi najważniejsze zagadnienia związane z zastosowaniem enzymów jako katalizatorów, metody immobilizacji enzymów, a następnie charakterystykę faz ciekłokrystalicznych i ich układów z enzymami. W dalszej części Doktorantka opisuje bezpośrednie i mediowane przeniesienie elektronu między enzymem i elektrodą i w tym kontekście podaje również informacje na temat własności elektrochemicznych dehydrogenazy celobiozowej, dehydrogenazy fruktozowej oraz oksydazy bilirubinowej. Rozdział ten wieńczy fragment dotyczący biosensorów oraz bioogniw paliwowych oraz krótka charakterystyka stosowanych technik badawczych.

Część eksperymentalna w sposób zwięzły przedstawia opis stosowanych odczynników oraz większości urządzeń i zastosowanych procedur. W bardziej szczegółowy sposób Autorka omawia przygotowanie roztworów enzymów do immobilizacji na elektrodach stosowanych w eksperymentach oraz syntezę nanocząstek złota i modyfikacje nanorurek węglowych. Dziwić może umiejscowienie metodyki, procedur i odczynników zastosowanych do krystalizacji FDH w części obejmującej rezultaty badań (str. 67), podczas gdy część eksperymentalna formalnie kończy się na stronie 54.

Kolejna część pracy omawia wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań i zawiera cztery podrozdziały dotyczące kolejno: i) badań elektrochemicznych stosowanych enzymów zaadsorbowanych na elektrodach z użyciem nanorurek węglowych, ii) krystalizacji FDH, iii) charakterystyki elektrochemicznej enzymów immobilizowanych w fazie kubicznej oraz iv) badań skonstruowanych bioogniw i bioogniw hybrydowych.

Pracę zamykają: część zawierająca uwagi końcowe i perspektywy wykorzystania badanych układów w przyszłości, podsumowanie oraz dość obszerny, bo zawierający 171 pozycji, spis cytowanej literatury.

Praca napisana jest dość poprawnym i w większości zrozumiałym językiem a ilość literówek oraz błędów językowych nie jest znacząca. Niestety na kilku stronach niniejszej rozprawy można zauważyć powtórzenia znaczącej części tekstu, ma to miejsce między innymi na stronie 4 (te same 4 linijki tekstu pojawiają się w dwóch miejscach) oraz stronach 65 i 66 (6 dokładnie tych samych linijek). Autorka w sposób stosunkowo dowolny zapisuje te same jednostki (raz w postaci ułamka, kiedy



indziej w potęgde -1 np.  $\text{cm}^2/\text{s}$  – str. 22 vs.  $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$  – strona dalej). Dziwić może również umiejscowienie numeru odnośnika literaturowego w tytule podrozdziału (4.3.3) zarówno w spisie treści, jak i dalszej części pracy doktorskiej.

Jakość niektórych rysunków jest wyjątkowo słaba (np. rysunek 3), co szczególnie dziwi w przypadku ilustracji własnych wyników (rys. 20 i 21), lub też rysunki są zbyt małe (np. rysunek 15 lub 56a). Na rysunku 39 trudno odnaleźć kwadrat, a odchylenia standardowe dla znaczników w postaci szarych kółek nie są widoczne. Niedociągnięciem redakcyjnym jest też fakt, iż podpis rysunku znalazł się na innej stronie niż sam rysunek (dotyczy rysunku 3 i 39). Ponadto część podpisów rysunków jest zakończona kropką, a część nie (np. rys. 5 vs. rys. 8).

### *Ocena merytoryczna rozprawy*

Część literaturowa niniejszej rozprawy dość dobrze wprowadza czytelnika w tematykę badań prowadzonych przez Doktorantkę. Wszystkie podrozdziały tej części pracy, dodatkowo bogato ilustrowane, pomagają czytelnikowi w uzyskaniu wiedzy mogącej służyć za podstawę w zrozumieniu założeń pracy oraz przedstawionych wyników badań i wyciągniętych wniosków. Wystarczająco szeroko przedstawione zostały zagadnienia związane z pochodzeniem, budową i działaniem enzymów, w tym w szczególności oksydoreduktaz wykorzystywanych w badaniach tj. CDH, FDH i BOD. Dość szczegółowo omówione zostały zagadnienia związane z przeniesieniem elektronu z enzymu do elektrody/lub odwrotnie zarówno w przypadku zastosowania mediatorów, jak i mechanizmu bezpośredniego transferu. Autorka przedstawiła również informacje na temat biosensorów, w tym w szczególności elektrochemicznych biocujników glukozy z podziałem na generacje, co nierozdzielnie związane jest z praktycznym zastosowaniem oksydoreduktaz. Dość skromnie wygląda natomiast rozdział dotyczący bioogni enzymatycznych. W kontekście tematyki recenzowanej pracy zagadnienie to powinno zostać potraktowane szerzej i omówione bardziej szczegółowo (omówienie zajmuje 1 stronę pracy). Autorka kończy część literaturową omawiając podstawowe techniki badawcze zastosowane przy wykonywaniu badań do niniejszej pracy. Przedstawia też najważniejsze parametry pozwalające na ewaluację działania ogni i bioogni i niewątpliwie jest to istotna część niniejszej pracy. Część literaturowa powstała w oparciu o 133 prace źródłowe w dużej mierze opublikowane w XXI wieku, co dowodzi aktualności przedstawionej tematyki, a także dobrego rozeznania Autorki w literaturze tematu.

Część eksperymentalna, opisująca zastosowane odczynniki, urządzenia i metodykę pracy, jest dość krótka, zawiera się bowiem na 8 stronach, z czego 2 dotyczą modyfikacji nanorurek węglowych przeprowadzonej na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, co Doktorantka wyraźnie zaznaczyła. Można odnieść wrażenie, że w niektórych aspektach opis stosowanych procedur jest dość enigmatyczny i szersze ich omówienie skutkowałoby lepszym zrozumieniem wyników przeprowadzonych eksperymentów, o czym szerzej napiszę dalej. W szczególności dziwi opis przygotowania roztworów enzymów tytułowany jako opis przygotowanie elektrod.



Kolejna część pracy doktorskiej dotyczy przedstawienia i omówienia wyników przeprowadzonych eksperymentów. Rozdział 5.1 poświęcony jest badaniom elektrochemicznym bioelektrod otrzymanych poprzez adsorpcję dehydrogenazy celobiozowej, dehydrogenazy fruktozowej lub oksydazy bilirubinowej na elektrodach węglowych wykorzystując również różne nanocząstki do modyfikacji wybranych elektrod. Doktorantka w sposób poprawny przypisała obserwowane na woltamogramach sygnały poszczególnym procesom elektrodowym różnych kofaktorów czy też domen testowanych enzymów. W przypadku badań nad BOD doktorantka przetestowała możliwość zastosowania techniki „layer by layer” dodatkowo wykorzystując zsyntezowane nanocząstki złota i w ten sposób osiągając najlepszą jak dotąd opisaną gęstość prądu redukcji tlenu dla bioelektrody modyfikowanej BOD, która wyniosła  $650 \pm 39 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . W porównaniu z dość szczegółowo omówionymi wynikami dla CDH i BOD podrozdział poświęcony FDH prezentuje się wyjątkowo skromnie, aczkolwiek na podstawie bardzo niewielu eksperymentów wykorzystując elektrody sitodrukowane Doktorantka twierdzi, że najlepszym modyfikatorem powierzchni zastosowanych elektrod jest grafen. Moim zdaniem na podstawie tak niewielu badań nie można wysnuć tak daleko idących wniosków, aczkolwiek w kontekście tego enzymu Autorka wspiera się doniesieniami literaturowymi. W związku z tym pojawia się pytanie: czy badania FDH na innych elektrodach np. z węgla szklanego nie stanowiły żadnej nowości naukowej i dlatego Autorka ich nie przeprowadziła?

Kolejną częścią pracy jest rozdział 5.2 zatytułowany „Próba krystalizacji FDH ‘in meso’”. Oprócz zaskakująco umiejscowienia opisu metodyki krystalizacji i braku komentarzy do wielu wykresów w tej części pracy, nie rozumiem także dlaczego Autorka poświęciła w rozprawie doktorskiej tak dużo uwagi eksperymentom nie prowadzącym do żadnych interesujących rezultatów ani wniosków. Rozdział 5.2 stanowi prawie 20% części opisującej wyniki doktoratu. Czy badania te były, aż tak kluczowe? Jakie modyfikacje w zastosowanych metodach należy przeprowadzić, aby uzyskać kryształ(y) białka?

Rozdział 5.3 dotyczy charakteryzacji testowanych enzymów w fazach kubicznych i wykazania przewag takiej immobilizacji nad prostą adsorpcją. Największa część tego rozdziału skupia się na wszechstronnych badaniach CDH zarówno pod kątem mediowanego (stosując różne mediatory), jak i bezmediatorowego przeniesienia elektronu. Autorka opisuje interesujące eksperymenty służące zwiększeniu stabilności i wydajności katalitycznej tego enzymu, co dzięki zastosowaniu faz kubicznych udaje się uzyskać. Szczególnie ciekawe i wartościowe badania Autorka przeprowadziła wykorzystując bioelektrodę modyfikowaną nanorurkami węglowymi z dowiązaniem mediatorem DCPIP. Zdecydowanie krótszy fragment tego rozdziału dotyczy badań BOD w fazie kubicznej. Autorka zbadała i opisała układ, w którym enzym ten w połączeniu z nanorurkami węglowymi i nanocząstkami złota (opisany w podrozdziale 5.1.2) immobilizowany był dodatkowo w fazie kubicznej. Zabieg ten pozwolił zdecydowanie polepszyć stabilność enzymu w czasie i nawet po tygodniu od przygotowania enzym na takiej bioelektrodzie zachował ponad 70% aktywności. W rozdziale tym nie



ma przedstawionych badań bioelektrod z FDH w fazie kubicznej. Czy podyktowane było to nieudaną krystalizacją FDH?

W rozdziale 5.4 Autorka opisuje ewaluację skonstruowanych bioogniw i hybrydowych bioogniw przede wszystkim pod kątem ich mocy i napięcia obwodu otwartego. Co ważne, wskazuje również na kolejne przewagi immobilizacji enzymów w fazie kubicznej w przypadku zastosowania układów przepływowych. W takim przypadku wybrany rodzaj immobilizacji ogranicza wymywanie enzymu z powierzchni bioelektrody.

Uwagi końcowe i perspektywy wykorzystania badanych układów w przyszłości, a także podsumowanie dobrze porządkują wyciągnięte przez Doktorantkę wnioski, podkreślają zalety zastosowanych rozwiązań i wskazują najważniejsze osiągnięcia niniejszej pracy doktorskiej.

Należy podkreślić, iż jedną z ról recenzenta jest obowiązek wytknięcia Autorce niedociągnięć pracy. Dlatego też sumiennie wywiązuję się z tego obowiązku i poniżej wymieniam swoje szczegółowe uwagi do niniejszej rozprawy i pytania do jej Autorki (do omówienia w czasie publicznej obrony):

- Str. 4: Co Autorka w odniesieniu do enzymów rozumie jako: „... without being consumed themselves”? Moim zdaniem taka konstrukcja może sugerować istnienie biologicznego/chemicznego „kanibalizmu”, który chyba jednak nie bywa obserwowany.
- Str. 6: Błędem jest stwierdzenie, że: „białka katalizują przeniesienie elektronu poprzez redukcję lub utlenienie substratu...” - enzymy katalizują reakcje chemiczne.
- Str. 9: Dlaczego jako jeden z akceptorów elektronu, pośród barwników, Autorka wymienia potas?
- Str. 10. Autorka pisze o budowie BOD, podając informację o liczbie i sekwencji aminokwasów pisząc: „...DNA sequence...”.
- Str. 10 i inne: Autorka pisząc o miedziowych kofaktorach BOD czasami podaje informację, że to jony, czasami, że atomy, dlaczego?
- Str. 12: Czy prawdą jest, że aby unieruchomić enzym potrzebna jest powierzchnia przewodząca?
- Str. 12 i 13: Ostatnie zdanie rozpoczynające się na stronie 12 jest niejasne i sprawia wrażenie dziwnego połączenia dwóch osobnych zdań.
- Str. 14: „...polymers, hydrogels, self-assembled monolayers...” to nie metody immobilizacji. Co w ogóle oznacza stwierdzenie: “to immobilize enzymes through direct and mediated electron transfer”?
- Str. 15: Co to są: “Osmium polymers” nazwane również „Os-redox polymers”? Czy to ich poprawne nazwy?

- Str. 17: Czy stwierdzenie, że: "monoolein...is often used as food emulsion" jest poprawne?
- Str. 27: Zdanie: „Another important requirement...proteins on metal surfaces" jest niezrozumiałe.
- Str. 28: Dlaczego Autorka w kontekście MET i DET pisze tylko o elektrodach metalicznych, a nie wspomina o węglowych, które sama zresztą potem stosuje? Czy w kontakcie z elektrodami węglowymi enzymy również mogą ulegać denaturacji?
- Str. 28: Pisząc o roli mediatora, stwierdzenie, że mediator oddziałuje z elektrodą jest błędem, gdyż Autorce chodzi przede wszystkim o proces elektrodowy (utlenienie lub redukcję).
- Str. 34: Podana definicja biosensora rozpoczynająca się od słów „In other words..." jest tak naprawdę definicją sensora chemicznego, a nie biosensora. Co wyróżnia biosensory?
- Str. 34: Autorka nie dość wyraźnie zaznaczyła, że mówienie o biosensorach pierwszej, drugiej i trzeciej generacji zarezerwowane jest do biosensorów elektrochemicznych (w tym przede wszystkim biosensorów glukozy). Oksydoreduktazy można również wykorzystać w połączeniu np. z przetwornikami optycznymi i wtedy trudno mówić o generacjach.
- Str. 36: Czy glukoza ma centrum aktywne? Tak napisała Autorka.
- Str. 36: Autorka twierdzi, że półogniwa ogniwa paliwowego oddzielone są membraną jonoselektywną (co najmniej dwukrotnie)! Czy to prawda? Jaka jest różnica między membranami jonoselektywnymi a membranami stosowanymi w ogniwach paliwowych?
- Str. 37: Stwierdzenie, że: „ When biological materials are used, such cells become biofuel cells..." jest zbyt lakoniczne. Brakuje tu stwierdzenia jaką funkcję mają pełnić te materiały pochodzenia biologicznego
- Str. 37: Co miała na myśli Autorka pisząc: „Because of the big availability of carbohydrates in nature, they are generally used in wastewater treatment”?
- Str. 37: Jaka jest różnica między specyficznością a selektywnością enzymów, skoro Autorka wymienia je obok siebie?
- Str. 38: Autorka pisząc generalnie o woltamperometrii, choć w rozdziale o woltamperometrii cyklicznej, dość niefortunnie podaje informacje, że potencjał zmieniany jest liniowo w czasie. Ta informacja nie jest prawdziwa dla wszystkich technik woltamperometrycznych, a takie można odnieść wrażenie czytając ten fragment.



- Str. 39: Legenda wykresu 13 jest niezrozumiała. Co oznacza stwierdzenie: „Enzymatic reaction cyclic voltammetry”?
- Str. 39: Dlaczego Autorka pisząc o przebiegu krzywych woltamperometrycznych i procesach przyczyniających się do powstawania charakterystycznych sygnałów używa słowa „charges” zamiast „electrons”.
- Str. 44: Do czego odnosi się ostatnie zdanie w rozdziale 3.3? W szczególności nie rozumiem stwierdzenia o wyższej aktywności w łagodnych warunkach (względem czego Autorka porównuje tę aktywność?).
- Str. 46: Autorka podała błędny wzór hexaammineruthenium(II) chloride.
- Str. 49: Dlaczego w przypadku FDH Autorka nie podała (nie zbadała) aktywności enzymu? Aktywność podana jest zarówno dla CDH, jak i dla BOD (zapisanej tu jako BOD).
- Str. 49 i dalej: Autorka używa przypadkowej ilości cyfr znaczących np. w odniesieniu do pH. Czy pH 7 oznacza 7,0, czy też może 7,4?
- Str. 51: Dlaczego w opisie syntezy nanocząstek złota dla jednego z odczynników podano stężenie molowe, dla innego liczbę moli, a dla kolejnego tylko objętość? Ponadto Autorka źle zapisała liczbę Stocka dla związku złota (po spacji).
- Str. 56: Nie rozumiem w jaki sposób gładkość powierzchni elektrody z węgla szklanego skorelowana jest z przewodnością? Czy Autorce chodziło o zwiększenie powierzchni elektrochemicznej elektrody? Ponadto w pracy nie przedstawiono informacji wg jakiego klucza Autorka dobierała rodzaj zastosowanych nanorurek węglowych. Czy dobierane były one przypadkowo, czy ze względu na stosowany enzym, czy też może podłoże i dlaczego?
- Str. 60: Dlaczego w przypadku badania właściwości katalitycznych BOD nie podano ilości enzymu naniesionego na elektrodę (tak jak zrobiono to w przypadku CDH)? Takiej informacji nie ma też w części eksperymentalnej. Znajduje się ona natomiast na stronie 61 w opisie kolejnych badań. Czy wcześniej zastosowano taką samą ilość?
- Str. 62: Autorka nie podała informacji dla jakiej elektrody z trzech testowanych zaprezentowano krzywą (a) na wykresie 25. Moim zdaniem należało pokazać trzy krzywe dla wszystkich testowanych elektrod w warunkach beztlenowych. Autorka nie podała w tym przypadku szybkości skanowania (w przypadku większości wykresów taka informacja jest podana).
- Str. 63 i dalej: W tekście pracy nie ma odniesienia do wykresów 26, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 41, 49 oraz tabeli 6, co jest dużym uchybieniem.

- Str. 64. Na podstawie ilu pomiarów wyznaczono gęstość prądu i jej odchylenie standardowe dla elektrod modyfikowanych BOD metodą LbL? Taka informacja nie znajduje się w pracy.
- Str. 78 i 79: Pomimo opisu na stronie 78 i legendy wykresu 37 Autorka nie przedstawiła wyników eksperymentów woltamperometrycznych w buforze o pH 3,6. Ponadto na wykresie można znaleźć krzywe otrzymane w eksperymencie w buforze o pH 7,8, podczas gdy w tekście opisującym rezultaty eksperymentu jest mowa o pH 7,5.
- Str. 80: Ponownie trudno się zorientować w jakim pH prowadzone były eksperymenty. Czy dla lepszego porównania nie należało zbadać charakterystyki elektrody z CDH w buforze MOPS nie zawierającym ani jonów wapnia, ani magnezu oraz zawierającym jony magnezu i w ten sposób wyeliminować potencjalny wpływ anionów na działanie enzymu?
- Str. 81: W opisie badań stabilności faz kubicznych oraz na wykresie 39 nie wspomniano dla ilu elektrod każdego typu prowadzono badania. Jak obliczono odchylenia standardowe?
- Str. 83: Informacje zawarte w opisie wyników dotyczących badania w czasie elektrod z CDH immobilizowaną w fazie kubicznej nie są spójne z wykresem 41. Czy drugi eksperyment przeprowadzono po 8 czy 28 dniach?
- Str. 84: Noszący znamiona informacji czysto literaturowej akapit dotyczący zmiany wartości współczynnika dyfuzji mediatorów na skutek pułapkowania w fazie kubicznej jest moim zdaniem umieszczony na stronie 84 przypadkowo. Dlaczego Autorka umieściła te informacje w tym miejscu pracy, skoro w żaden sposób nie korespondują z zawierającym omówienie wyników akapitem poprzedzającym ani akapitem następującym po nim?
- Str. 84: Dlaczego znając ograniczenia rozpuszczalności DCPIP w fazie kubicznej Autorka nie zaplanowała eksperymentu z tożsamym, jak w fazie kubicznej, stężeniem DCPIP w fazie wodnej, tylko testowała próbki o wyższym stężeniu tego mediatora?
- Str. 85: Zamiast odniesienia do wyników badań przedstawionych na wykresie 44 Autorka powinna przywołać wykres 43.
- Str. 85 i dalsze: Autorka nie zdefiniowała oznaczeń a1, a2, c1 i c2 znajdujących się na wykresie 44. Dlaczego tylko w przypadku legendy wykresu 44 i kolejnych Autorka podała geometryczną powierzchnię elektrody pracującej wskazując na tę wartość jako podstawę obliczenia gęstości prądu? W jaki zatem sposób Autorka obliczała gęstość prądu w przypadku innych, wcześniej opisanych elektrod?



- Str. 88: Dlaczego legenda wykresu 45 mówi o „slow scan rate cyclic voltammogram” skoro w przypadku innych analiz z tą samą szybkością skanowania ( $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , a jest ich wiele, choćby te przedstawione na wykresie 44) tak ich nie określała?
- Str. 91, 92: W legendach wykresów 48 i 49 Autorka nie podała pH roztworu buforowego (co czyniła do tej pory zawsze).
- Str. 92: Autorka odnosząc się do opisu wyników pomyliła wykresy (51 zamiast 50).
- Str. 93: Dlaczego eksperyment dotyczący charakteryzacji elektrochemicznej elektrody z CDH immobilizowaną w fazie kubicznej w roztworze glukozy przebiegał w buforze PBS z dodatkiem soli magnezu, skoro opisane wcześniej eksperymenty w roztworze laktozy przeprowadzano w buforze MOPS z dodatkiem soli wapnia. Co ważne, na stronie 80 Autorka wykazała, że większą gęstość prądu obserwuje się dla elektrod z CDH w przypadku buforu PBS z dodatkiem soli magnezu, dlatego więc w kolejnych eksperymentach (których wyniki przedstawiono na wykresach 41-49) Autorka stosowała MOPS z dodatkiem soli wapnia?
- Str. 94: W zdaniu rozpoczynającym się od „This implies...” zgubiona została logika wypowiedzi. Zdanie sugeruje, że poprawa działania BOD wynika z powierzchni elektrody z węgla szklanego.
- Str. 96: Dlaczego badania dotyczące określenia optymalnego pH działania BOD pokazano w pracy tak późno? W tym miejscu stwierdzono, że największą aktywność obserwuje się w pH 6 (6,0?), dlaczego więc eksperymenty opisane na stronach 60-65 przeprowadzano w pH 7,0? Mogę na tej podstawie domniemywać, że konstrukcja dysertacji jest podyktowaną nie logiką a chronologią. Czy tak jest?
- Str. 111: Wartość OCV przedstawiona na tej stronie (540 mV), różni się od tej podanej/pokazanej na stronie 99, dlaczego?

Podsumowując, należy stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska zawiera znaczny aspekt praktyczny i pomimo niedociągnięć redakcyjnych i merytorycznych stanowi wkład w poszerzanie wiedzy na temat właściwości elektrochemicznych oksydoreduktaz oraz ich wykorzystania praktycznego w konstrukcji bioogniw. Autorka przetestowała szereg układów enzym/mediator, a także badała możliwość niemediowanego transferu elektronu stosując różne metody immobilizacji enzymów, i tak dobierając warunki, aby w etapie końcowym otrzymać bioogniwa o jak największej mocy i napięciu obwodu otwartego. Ponadto Autorka wykazała dobrą kompatybilność badanych enzymów z fazami kubicznymi i wskazała na znacząco większą trwałość i stabilność bioelektrod z enzymami immobilizowanymi w ten sposób.

Wg bazy Scopus wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę i opisanych w ramach recenzowanej rozprawy zostały opublikowane w 2 artykułach z listy JCR w dobrych czasopismach elektrochemicznych i bioelektrochemicznych. Badania te zostały przeprowadzone w pewnym zakresie w ramach współpracy (również międzynarodowej), co niewątpliwie zasługuje na podkreślenie i słowa uznania w dzisiejszych czasach, kiedy współpraca jest jednym z najważniejszych kół zamachowych nauki i postępu.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Valentyny Grippo spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 roku (wraz z późniejszymi poprawkami) podanymi w Ustawie "Prawo o szkolnictwie wyższym" i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Doktorantki do publicznej dyskusji nad rozprawą.

dr hab. inż. Mariusz Pietrzak

