



# **Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk**

Zakład Procesów Elektrodynamicznych

Prof. dr hab. Marcin Opałło

ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

Tel. +(48 22) 632 32 21 wew. 3375,3130

Fax +(48 22) 632 52 76

+(48 22) 631 16 19

E-mail: mopallo@ichf.edu.pl

18 października 2019

## **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Kizlinga z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego**

Rozprawa doktorska mgr Michała Kizlinga "Designing enzymatic fuel cell based on pseudocapacitive materials" dotyczy, jak można sądzić na podstawie tytułu, konstrukcji enzymatycznych bioogniw paliwowych z wykorzystaniem materiałów pseudopojemnościowych". Od razu nasuwa się pytanie, a cóż to za materiały? Co więcej, uważna lektura rozprawy wskazuje, że temu zagadnieniu poświęcony jest tylko jeden, przynajmniej finałowy, z pięciu rozdziałów części zatytułowanej części „Results and discussion”. Niemniej należy podkreślić, że pozostałe rozdziały rozprawy zostały poświęcone innym, równie interesującym zagadnieniom dotyczącym katod i anod bioogniw paliwowych oraz mechanizmom procesów na nich przebiegających. Nic w tym dziwnego, ponieważ badania zostały wykonane pod kierunkiem prof. dr. hab. Renaty Bilewicz, specjalistki w tym obszarze, który nadal znajduje się w centrum uwagi licznych grup badawczych. Choć chyba ostatnio entuzjazm badaczy zajmujących się bioogniwami paliwowymi i zagadnieniami z nimi związanymi nieco osłabł, ale nadal wiele się dzieje. Na pewno zagadnienia, którymi zajął się Doktorant należą do najbardziej aktualnych, mówiąc kolokwialnie są na topie. Drugim promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Jerzy Rogalski biochemik, specjalista od enzymów, którego udział w tego typu badaniach jest nieoceniony, o czym mogłem się kiedyś przekonać.

Układ rozprawy jest w miarę standardowy. Na samym początku Autor w krótkim wstępie opisuje celowość badań nad bioogniwami paliwowymi wskazując ich zalety i wady. Podkreśla wagę ostatnich prac dotyczących elektrod modyfikowanych kilkoma enzymami i wskazuje konieczność usprawnienia tych bioogniw paliwowych, których paliwem jest powszechnie dostępna sacharoza oraz przedstawia cel swojej pracy. Jako antidotum na niską moc takich ogniw proponuje ich integrację z superkondensatorami co ma umożliwić generowanie dużej mocy w postaci pulsów. Z całkiem sporej palety enzymów wybiera dehydrogenazę fruktozową i glukozową oraz inwertazę i mutarotazę. Te enzymy bądź ich kombinacja (kaskada enzymatyczna) mają zostać wykorzystane do utleniania w bioogniwie takich paliw jak fruktoza, glukoza czy wspomniana wcześniej sacharoza. Natomiast jako katalizator redukcji tlenu mgr Kizling proponuje powszechnie stosowaną lakazę. Zgodnie z propozycją Doktoranta ten zestaw enzymów ma zapewnić wydajną pracę bioogniwa paliwowego sprzężonego z superkondensatorem celulozowo-pirolowym. Opis zawarty we wstępie daje pewne pojęcie o zamiarach Doktoranta, choć wolałbym, żeby cel badań został podany wprost. Za to na końcu tego rozdziału pojawia się już jeden z najważniejszych wyników!

W części literaturowej Autor opisuje podstawowe zagadnienia związane z bioogniwami paliwowymi. Mamy tu ich opis termodynamiczny ogniw paliwowych, próbę dyskusji czy enzymy są dobrymi katalizatorami podpartą opisem termodynamiki i kinetyki reakcji enzymatycznych, opis trzech sposobów wymiany elektronów pomiędzy elektrodą i enzymami, gdzie Doktorant słusznie wyróżnia nanomateriały jako przenośniki elektronu, przegląd sposobów immobilizacji enzymów oraz krótki opis kaskad enzymatycznych. Następnie Doktorant dość szczegółowo omówił enzymy oraz materiały wykorzystane do modyfikacji elektrod. Przegląd ten pozwala dobrze zrozumieć ich dobór i wprowadza do części rozprawy zawierającej wyniki ich dyskusję.

W trzeciej części rozprawy znajdziemy opis stosowanych technik elektrochemicznych i nieelektrochemicznych. Jak wielu innych badaczy zajmujących się właściwościami elektrochemicznymi enzymów Doktorant wyróżnia voltametrię warstwy białka oraz jej hydrodynamiczną odmianę. O ile nie jestem przekonany co do traktowania jej jako osobnej techniki to trzeba przyznać, że w ciągu 30 lat nagromadzono sporą wiedzę dotyczącą interpretacji takich voltamogramów i jej wybrane aspekty przedstawia Doktorant. Podrozdział dotyczący wirującej elektrody

dyskowej mgr Kizling zilustrował pochodzącym z literatury rysunkiem elektrochemicznego szkła powiększającego, „widzącego” elektrodę modyfikowaną enzymami system oporników, kondensatorów etc. Moim zdaniem taki pełny sposób „widzenia” można uzyskać tylko elektrochemiczną spektroskopią impedancyjną.

W Części czwartej zatytułowanej „Experimental” Autor jasno opisuje używane odczynniki i przyrządy.

Część piąta „Results and Discussion” jest z natury swojej najobszerniejsza. Doktorant rozpoczyna od opisu badań właściwości elektrody modyfikowanej wielościennymi nanorurkami węglowymi, dehydrogenazą glukozowo-fruktozową i w niektórych przypadkach naftochinonową pochodną pirenu. Co prawda stwierdzenie, że na woltamogramie zamieszczonym na rysunku 41A można zauważyć „four well defined and respective redox peaks” jest przesadą. Niemniej na pewno Autorowi udało się bez żadnych wątpliwości te procesy zidentyfikować. Za pomocą zależności od pH, przyporządkował je reakcjom poszczególnych elementów enzymu co nie jest trywialne. W roztworze fruktozy elektrody te wykazują aktywność bioelektrokatalityczną, której maksimum wypada w pH 6, a obecność mediatora na nią istotnie nie wpływa. Ciekawe dlaczego? Badania kinetyki tych reakcji wymagają eksperymentów na wirującej elektrodzie dyskowej i takie badania Doktorant przeprowadził. Na ich podstawie wyznaczył parametry kinetyczne reakcji, które dla reakcji z mediatorem i bez niewiele się różnią. Autor sugeruje, że w obecności mediatora ścieżka przeniesienia elektronu do elektrody poprzez części hemowe zostaje wyłączona. Elektron jest przenoszony przez FAD i mediator. Ta hipoteza może być trafna tylko pozostaje pytanie dlaczego tak się dzieje.

Następnie Doktorant opisuje próbę narzucenia korzystnej orientacji enzymu na powierzchni elektrody poprzez jej modyfikację nanocząstkami superparamagnetycznego tlenku żelaza. Jak się okazało pomysł był dobry bo taka modyfikacja zwiększa gęstość prądu związanego z reakcją katalityczną i obniża potencjał początkowy. Niestety zabrakło ślepej próby z elektrodą modyfikowaną samymi nanocząstkami, które też mogą generować sygnał elektrochemiczny związany z reakcją redoks i ewentualnie działać jako katalizator. Ponadto przydałoby się dokładniejsze niż w rozprawie wyjaśnienie efektu pola magnetycznego na potencjał utleniania fruktozy (str. 104). Wydaje mi się też że na analizę kinetyczną może mieć wpływ ewentualna desorpcja enzymu, a nie stabilność enzymu jako takiego, co moim zdaniem wynika z tekstu (str. 104).

Aby zwiększyć przewodnictwo elektryczne warstwy pokrywającej elektrodę Autor wprowadza do niej nanocząstki złota i pochodną tiolową mediatora. Metodą wagi kwarcowej kontroluje adsorpcję enzymu, tylko nie wiem na czym opiera stwierdzenie o uformowaniu się jego monowarstwy (str. 111). Ponownie Doktorant identyfikuje procesy redoks składników enzymu i ponownie nie wykonuje ślepej próby. A część ładunku elektrycznego związana z układem pików przy potencjale ok. 0.1 V może pochodzić od procesu redoks nanocząstek tym bardziej, że pik katodowy jest rozszczepiony. Na podstawie m. in. analizy kinetycznej Doktorant proponuje m. in. rozróżnienie słabego i silnego bezmediatorowego przeniesienia elektronu w nieobecności i obecności pola magnetycznego (Fig. 62). To ciekawa koncepcja. Porównanie tego schematu ze schematem pokazującym strukturę elektrody bez nanocząstek złota wskazuje, że w obecności nanocząstek złota enzym nie adsorbuje się na nanocząstkach tlenku żelaza. Pytanie dlaczego?

Następnie Doktorant opisuje badania elektrod modyfikowanych warstwą tioli i lakazą. Na początku Autor podjął się zadania jak pisze określenia orientacji enzymu na powierzchni monowarstwy tioli osadzonej na elektrodzie złotej. Zidentyfikował obecność cząsteczek lakazy na powierzchni metodą skaningowej mikroskopii tunelowej, a następnie oszacował siłę jego oddziaływań z powierzchnią metodą spektroskopii sił atomowych na pojedynczej cząsteczce, uwzględniając stochastyczną naturę procesu w nanoskali, wnioskując o specyficznych oddziaływaniach tylko w przypadku naftochinonowej pochodnej tiolu. Następnie potwierdził adsorpcję enzymu bardziej tradycyjnymi metodami takimi jak mikrowaga kwarcowa i spektroskopia impedancyjna. Trochę zaskakujący jest tylko wynik analizy dwóch spośród trzech widm impedancyjnych przedstawionych na rys. 71A z wykorzystaniem elementu Warburga skoro nachylenie części widma zarejestrowanego przy niskich częstotliwościach dla elektrody modyfikowanej 4-aminotiofenolem nie wynosi 0.5. Niestety brak statystyki dopasowania nie pozwala ocenić jego prawidłowości.

I w przypadku tych elektrod Doktorantowi udało się zarejestrować sygnał związany z procesem redoks lakazy, konkretnie T1, a także stwierdzić jej aktywność katalityczną. Na podstawie różnicy aktywności katalitycznej, wielkości sygnału redoks Doktorant wnioskuje o orientacji lakazy wymuszonej oddziaływaniem „hydrofobowej kieszeni” i grupy naftochinonowej.

Ostatni rozdział rozprawy dotyczy biosuperkondensatora zbudowanego z wykorzystaniem kompozytu celulozowo-polipirolowego i wykorzystania kaskady enzymów do anodowego utleniania sacharozy. Kaskada ta składa się z trzech enzymów dehydrogenazy fruktozowej i glukozowej oraz inwertazy i mutarotazy. Autor dokonuje charakterystyki anody i katody tego urządzenia, z wykorzystaniem wirującej elektrody dyskowej. Tylko w obecności tych czterech enzymów udało się uzyskać (jak się domyślam bez mieszania?) imponującą gęstość prądu anodowego prawie  $2 \text{ mA cm}^{-2}$ . Pytanie jak długo? Z kolei enzymem redukującym tlen jest lakaza, ale gęstość prądu i stabilność tej elektrody nie jest znana.

Jak można się domyślać, bo niestety Autor nie zamieścił jasnego schematu (Fig. 77), te dwie elektrody składają się na proponowane źródło prądu mające być tytułowym efektem rozprawy. Co więcej Doktorant nie zamieścił schematu obwodu, w których mierzył jego parametry, do którego się odnosi w tekście, np. na str. 153. Mojej konfuzji dopełnia fakt, że eksperymenty były robione w warunkach przepływowych. Pytanie dlaczego i jak na ich wyniki wpływa szybkość przepływu. Niewątpliwie, jak sam Doktorant to podkreślił (Fig. 89), proponowane urządzenie mieści się wśród dobrych superkondensatorów.

Praca jest napisana dobrym angielskim i bardzo dobrze się ją czyta mimo że Autor omawia każde zagadnienie szczegółowo. Umieszczenie wniosków po omówieniu każdego zagadnienia pomaga w śledzeniu rozprawy. Edycja jest staranna, zauważyłem tylko dwie literówki. Jedynie na str. 96 brakuje jednostek stałych szybkości reakcji katalitycznych. Użycie określenia „hydrodynamic electrode” (str. 68) zmusiło mnie do zastanowienia jak elektroda może być sama z siebie hydrodynamiczna? Ponadto na str. 94 występuje pojęcie „elektrokinetics” co wydaje się zbyt dużym skrótem. Grafika jest też staranna i czytelna. Co prawda w wersji papierowej niektóre wykresy są naprawdę małe, ale ich śledzenie w wersji elektronicznej nie stanowi problemu. Jedynie na widmach impedancyjnych brakuje zaznaczonych częstotliwości (Fig. 71,88) a podpis Fig. 77 dość istotnego w dyskusji jest nieadekwatny do przedstawionego schematu. Natomiast zaskakuje brak zaznaczenia błędów oszacowania potencjałów redoks. Zważywszy, że na niektórych woltamogramach piki nie są dobrze wykształcone analiza błędów jest niezbędna, chociażby do oszacowania błędu często wykorzystywanej w dyskusji przez Doktoranta zależności potencjału redoks od pH.

Najważniejsze jednak jest to, że w rozprawie, do której za pomocą licznych metod eksperymentalnych uzyskano dużą liczbę ważnych wyników, a ich dyskusja przeprowadzona została w sposób obszerny i dogłębny. Jest to dziś niestety rzadko spotykane w rozprawach. Doktorant wykorzystuje prawie wszystkie zebrane przez siebie informacje, a także dane literaturowe, aby zrozumieć badany układ i co więcej próbuje przewidzieć jakie znaczenie mają uzyskane przez niego wyniki. To zdecydowanie wyróżnia tę rozprawę spośród ponad dwudziestu, które miałem okazję recenzować. Moim zdaniem napisał ją całkiem dojrzały badacz i już z tego powodu zasługuje na wyróżnienie.

O doświadczeniu badawczym Doktoranta świadczy współautorstwo 11 publikacji w bardzo dobrych czasopismach elektrochemicznych i katalitycznych. W dziewięciu z nich jest pierwszym autorem. W czterech, w tym jednym artykule przeglądowym, została opublikowana część materiału opisanego w recenzowanej rozprawie. Należy się spodziewać kolejnych publikacji, ponieważ wiele z wyników otrzymanych przez Doktoranta stanowi godną uwagi nowość naukową. Należą do nich wyznaczenie potencjałów redoks dehydrogenazy fruktozowej, udana próba sterowania reakcją bioelektrokatalityczną przy pomocy polem magnetycznym, zidentyfikowanie typu oddziaływań lakazy z monowarstwą tioli metodą single molecule force spectroscopy oraz konstrukcja enzymatycznego źródła prądu napędzanego sacharozą. Jest to moim zdaniem kolejny argument za wyróżnieniem rozprawy

Uważam, że rozprawa doktorska "Designing enzymatic fuel cell based on pseudocapacitive materials." spełnia wymagania ustawowe i wnoszę o dopuszczenie mgr Michała Kizlinga do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z powodów, które opisałem wyżej wnioskuję także do Rady Wydziału Chemii UW o wyróżnienie rozprawy.

