



**LUND**  
UNIVERSITY

Lund June 13, 2019

ANALYTICAL CHEMISTRY/BIOCHEMISTRY

*Prof. Lo Gorton*

Professor Magdalena Maj-Zurawska  
Faculty of Chemistry  
University of Warsaw, Poland

First I would like to thank you for your trust and inviting me as external evaluator of Michał Kizling's doctoral thesis.

Mr. Michał Kizling, Faculty of Chemistry, University of Warszawa, Poland, has written a thesis for the PhD level entitled: "Designing Enzymatic Fuel Cell Based on Pseudocapacitive Materials". The thesis is based on Kizling's 7 experimental work, some of which already published in peer reviewed international periodicals (see below), and with Kizling as first author. Kizling additionally published 8 scientific papers. The sheer number of already published and/or submitted papers is impressive and must reflect a very hardworking graduate student. The published papers have already reached close to 300 citations, which also reflects a great interest in his published papers by the scientific community.

The thesis contains 183 pages and additionally 11 pages as introduction, which in turn consists of 6 parts/chapters covering basics in bioelectrochemistry, electrochemical and non-electrochemical techniques used in the experimental work, description of materials and instruments used, followed by an extended part in which the experimental results are given and discussed in detail. The thesis is covered with 269 relevant references. Largely, the thesis is well written and surely contains sufficient material to be accepted for the PhD level.

However, the thesis would very much benefit if the English language could be corrected and improved.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lo Gorton".

Lo Gorton, Professor emeritus in analytical chemistry, Lund University

---

Postal address: Lund University, Analytical Chemistry/Biochemistry, P.O. Box 124, SE-221 00 Lund, Sweden  
Visiting/goods address: Lund University, Biochemistry, Naturvetarvägen 12-18, SE-221 00 Lund, Sweden  
Telephone +46 46 222 7582 Telefax +46 46 222 4116  
E-mail: [Lo.Gorton@biochemistry.lu.se](mailto:Lo.Gorton@biochemistry.lu.se)

Further comments:

Page 6, lines 19-23: “The ability to orient the enzyme catalyzing the reduction of oxygen, in a manner reinforcing efficient direct electron transfer on self-assembled monolayers containing quinone derivative was investigated by AFM-based force spectroscopy and classical electrochemical techniques such as rotating disc electrode (RDE).” I cannot understand how this sentence is relevant for FDH.

Page 9: Equation (1) is valid for any reaction not only a reversible electrochemical reaction.

Page 10. Correct the Nernst equation.

Page 11. 2 lines from below: “Most enzymes are proteins.” I would argue that all enzymes are proteins.

Page 13, lines 14-15: “Iron-sulfur clusters are best known for their role in the redox reaction of mitochondrial ET [43].” I think they are well known in their own right.

Page 14, lines 5-8 below Fig. 4: “Common coenzymes present in enzymes used in EFC technology include FAD, NAD<sup>+</sup> and pyrroloquinoline quinone (PQQ) (**Figure 4**) for oxidation enzymes, Cu ions and iron/sulfur clusters in case of enzymes used for reduction of the oxidant.” I think this picture is too simple. I suggest the author to elaborate more on this.

Page 22, line 20: “The second substrate is often named as the natural redox mediator [48].” I do not support this. In reaction (21), O<sub>2</sub> is the natural electron **acceptor**, rather than mediator.

Page 25: I think the chapter of direct electron transfer is insufficient and in some parts wrong. I lack some basic concepts like; intrinsic versus extrinsic redox enzymes.

1/ Direct electrochemistry of proteins and enzymes, Lang-Hong Guo and H. Allen O. Hill, *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol. 36, pp. 340-374

2/ Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies, Christophe Léger and Patrick Bertrand, *Chem. Rev.* 2008, 108, 2379–2438

3/ Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors, L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F.D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, *Analytica Chimica Acta* 400 (1999) 91–108.

Some claims in the following text from page 25 are wrong: “Note that the described above mechanism is strict only when the enzyme contains one active site, *i.e.* glucose oxidase (GOx), NAD<sup>+</sup>-dependent glucose dehydrogenase or alcohol dehydrogenase [44]. More often oxidoreductases apart from the active site contain a chain of redox centers enabling intramolecular electron transfer (IET) on distances significantly exceeding 14 Å, *i.e.* multicopper oxidases (MCO), hydrogenases, nitrogenases, succinate dehydrogenase (**Figure 10**), fructose dehydrogenase (FDH) or FAD-GDH. Therefore, when DET is established between multi-redox centers enzyme and the electrode one must consider which moiety is a so-called exit site in the proposed system [59].”

Page 29. Too simple:” Mediators can be either present in solution or immobilized at electrode surfaces.” When immobilized they still need to access the active site. Elaborate a bit on this.

Too patronising for a PhD student to write: “Bartlett and Al-Lolage in the rather unsophisticated but suitable experiment, with GO<sub>x</sub>,”

No refs for statement: “Discussion about nanomaterials, their application, and influence on bioelectrocatalytic reaction is especially intense for GO<sub>x</sub> and its utilization in the 3<sup>rd</sup> generation of biosensors, undergoing DET reaction, without using redox mediator.”

Page 30, last line: “the enzyme surface charge or hydrophobicity” or hydrophilicity?

Page 31, in Table: “hindered conformation”, what is that?

Page 32, line 5: “huge organic molecules”. What is this? Why HUGE organic molecules?

Page 36: “At this boundary, two layers of ions with opposing polarity are formed when an external voltage is applied – one at the electrode surface and second is formed from dissolved and solvated ions distributed in the electrolyte that has moved towards the polarized electrode, with opposite polarity.” This is basically wrong. The EDL spontaneously forms as a result of a charge separation that occurs as the surrounding in all direction is not identical.

Page 45. The bacterial FAD-GDH exemplified on page 45 is just one such enzyme. There several other bacterial FAD-GDHs not necessarily containing FeS clusters. The part on glucose oxidizing enzymes is not so well written.

Page 54. “cellulose in the cells provides reinforcement in the form of scaffold in trees, plants, algae and other sea creatures (*e.g.* tunicates) [133].” In algae most of the cell wall is made of other polysaccharides than cellulose.

Page 55. I lack a reference to the legend of Fig. 27.

Page 58, line 3. “and the polymer that has already formed to their radical cation forms[160].” Please rephrase.

Page 61, line 14: “enhanced thermodynamic and kinetic parameters”. What are enhanced thermodynamic parameters and how can they be obtained through the use of AuNPs?

Page 63, lines 11-12: “flow through the counter electrode that is made of electrochemically inert metal (platinum, gold, **glassy carbon** *etc.*)”. Glassy carbon is not a metal.

Lines 15-16: “The potential of the reference electrode is usually related to the potential of the standard hydrogen electrode, which is chosen as a zero level.” Usually??

Lines 16-18: “When the measurement was performed in setting up comprised RE, most commonly the cathode was connected as a WE, whereas the anode was used as combined RE/CE.” Please explain.

Page 64, lines 11-13: “The technique shows the “potential dimension” in enzyme kinetics, which provides a good method to investigate complex multi-centered redox enzymes.” Please make this clear.

Page 65, line 8 from below: “and the same for each redox-center if a protein contains several.” This is wrong! *E.g.*, the area under the FAD wave (if it could be seen in FDH) should be twice the

area under each haem group as  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$  is a  $2\text{e}^-/2\text{H}^+$  reaction and  $\text{haem}_{\text{ox}}/\text{haem}_{\text{red}}$  is a  $1\text{e}^-$  reaction. See e.g. for CDH in C. Schulz, R. Kittl, R. Ludwig, L. Gorton, *ACS Catalysis*, 6 (2016) 555–563. **Direct electron transfer from the FAD containing dehydrogenase domain of cellobiose dehydrogenase to electrodes.**

Page 67, lines 4-7: “There are two well described and developed methods to address diffusion control: first, *via* a rotating disc electrode to gain hydrodynamic control; second use a microelectrode, where the diffusion is radial.” This statement is incomplete. The use of a flow through cell with defined flow profile (e.g., a wall jet cell) can be used to obtain the same results as with the RDE. J. Yamada, H. Matsuda, Limiting diffusion currents in hydrodynamic voltammetry: III. Wall jet electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 44 (1973) 189-198.

Line 5 from below: “steps up to which ET to and from the electrode is sufficiently fast so as not to be rate limiting.” What would then be the rate limiting step?

Page 70 starts with a description of the electrochemistry of the RDE in a solution containing a diffusing species. Then suddenly, with equation (41), the RDE is modified with a redox enzyme. Here there is a jump in the reasoning that needs to be corrected.

Please check and correct equation (45).

Page 72, lines 8-10: “In differential pulse voltammetry (DPV), fixed-magnitude pulses superimposed on a linear potential ramp are applied to the working electrode at a time just before the end of the drop.” Which drop is discussed? I think the author mixed this up with classical DME (dropping mercury electrode).

Page 73, lines 6-8: “DPV is a useful technique for measuring trace levels of organic and inorganic species at nanomolar concentrations”. Why is this mentioned here?

Page 79: Define  $f_0$ .

Lund Czerwiec 13, 2019

CHEMIA ANALITYCZNA/BIOCHEMIA  
Prof. Lo Gorton

Profesor Magdalena Maj-Żurawska  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Warszawski, Polska

Po pierwsze, chciałbym podziękować Pani Profesor za zaufanie i zaproszenie do zrecenzowania pracy doktorskiej p. Michała Kizlinga.

Michał Kizling, doktorant Wydziału Chemii (Uniwersytet Warszawski, Polska), przedłożył pracę doktorską pt. „Projektowanie enzymatycznych ogniw paliwowych na bazie materiałów superpojemnościowych”. Doktorat bazuje na 7 pracach eksperymentalnych, częściowo już opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych (patrz niżej), z p. Kizlingiem jako pierwszym autorem. P. Kizling jest również autorem 8 innych publikacji. Całkowita liczba dotychczas opublikowanych prac jest imponująca i sugeruje duże zaangażowanie w pracę naukową doktoranta. Dotychczas opublikowane prace dotychczas były cytowane prawie 300 razy, co sugeruje żywe zainteresowanie jego pracą środowiska naukowego.

Dysertacja zawiera 183 strony oraz 11 stron wstępu. Składa się z 6 części/rozdziałów, poświęconych podstawom bioelektrochemii, specyficznie zastosowanych technik pomiarowych (elektrochemicznych i nieelektrochemicznych), opisowi zastosowanych materiałów i aparatury oraz wynikom eksperymentalnym wraz z ich dokładnym opisem i wnioskami. Generalnie, dysertacja jest napisana dobrze, a jej wartość naukowa jest wystarczająca do przyznania autorowi tytułu doktora.

Jednakże należy nadmienić, że praca zyskałaby na wartości gdyby dokonano odpowiednich poprawek językowych.

Lo Gorton , Profesor emerytowany w chemii analitycznej , Uniwersytet w Lund

Dalsze komentarze:

Strona 6, wiersz 19-23: „Zdolność do orientacji białek katalizujących redukcję tlenu, w obecności pochodnych chinonu unieruchamianych w samozorganizowanych warstwach była badana za pomocą technik AFM oraz klasycznych metod elektrochemicznych, np. wirującej elektrody dyskowej.” Nie rozumiem w jaki sposób to zdanie odnosi się do FDH.

Strona 9: Równanie (1) jest poprawne dla każdej reakcji, nie tylko odwracalnych reakcji elektrochemicznych.

Strona 10: Proszę poprawić równanie Nernsta.

Strona 11, wiersz 2: „Większość enzymów jest białkami”. Moim zdaniem wszystkie enzymy są białkami.

Strona 13, wiersz 14-15: „Klastry żelazowo-siarkowe są najbardziej znane z roli pełnionej w mitochondrialnych reakcjach redoks”. Uważam, że są znane po prostu.

Strona 14, wiersz 5-8, pod Rys. 4: „Powszechnie stosowane koenzymy stosowane w enzymatycznych ogniwach paliwowych to m.in. FAD, NAD<sup>+</sup> i pirolochinolino chinon (PQQ) (Rys. 4) dla enzymów katalizujących reakcje utleniania, jony miedzi i klastry żelazowo-siarkowe zaś w enzymach katalizujących redukcję utleniacza”. Uważam, że ten obraz jest zbyt uproszczony. Sugeruję jego szerszą dyskusję.

Strona 22 wiersz 20: „Drugi substrat jest często określany mianem naturalnego mediatora redoks [48].” Nie zgadzam się. W przedstawionej reakcji (21) O<sub>2</sub> jest akceptorem elektronu, nie mediatora.

Strona 25: Uważam, że rozdział dotyczący bezpośredniego przeniesienia ładunku jest niepełny, a w pewnych punktach błędny. Brakuje pojęć takich jak intrinsic/extrinsic redox enzymes.

1/ Direct electrochemistry of proteins and enzymes, Lang-Hong Guo and H. Allen O. Hill, *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol. 36, pp. 340-374

2/ Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies, Christophe Léger and Patrick Bertrand, *Chem. Rev.* 2008, 108, 2379–2438

3/ Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors, L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F.D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, *Analytica Chimica Acta* 400 (1999) 91–108.

Część twierdzeń przedstawionych na Stronie 25 jest błędnych: „Należy zwrócić uwagę, że przedstawiony mechanizm jest ścisły tylko wtedy kiedy enzym zawiera jedno miejsce aktywne, np. oksydaza glukozy, NAD<sup>+</sup> zależna dehydrogenaza glukozy lub alkoholu [44]. Częściej jednakże oksydoreduktazy zawierają cały łańcuch przeniesienia ładunku składający się z łańcucha centrów redoks, umożliwiających wewnętrzny transfer ładunku na odległości znacznie przekraczające 14 angstromów, np. enzymy wielomiedziowe, hydrogenazy, nitrogenazy, dehydrogenazy bursztynianowe (**Rysunek 10**) dehydrogenaza fruktozy (FDH) czy FAD-GDH. Dlatego, kiedy rozpatrujemy mechanizm bezpośredniego przeniesienia ładunku między enzymem wielocentrowym a powierzchnią elektrody, należy rozważyć który element szlaku stanowi ogniwo końcowe [59].

Strona 29: Zdanie zbyt uproszczone: „Mediator może być rozpuszczony w roztworze jak i unieruchomiony na powierzchni elektrody”. Gdy mediator jest unieruchomiony wciąż wymaga dostępu do centrum aktywnego białka. Proszę to rozwinąć.

Zbyt protekcyjny ton jak na studenta studiów doktoranckich: ”Bartlett i Al.-Lolage za pomocą nieskomplikowanego aczkolwiek odpowiedniego eksperymentu z oksydazą glukozy (...).

Brak odnośników literaturowych: „Dyskusja na temat nanomateriałów, ich zastosowania i wpływu na reakcje bioelektrokatalityczne jest szczególnie intensywna dla oksydazy glukozy i jej zastosowania w biosensorach trzeciej generacji: jej zastosowania bez mediatora, bazując na bezpośrednim przeniesieniu ładunku.

Strona 30, ostatni wiersz: „ładunek powierzchniowy enzymy lub hydrofobowość” czy hydrofilowość?

Strona 31, w Tabeli: „naruszona konformacja”. Co to takiego?

Strona 32, wiersz 5: „duże cząsteczki organiczne”. Co to znaczy? Dlaczego DUŻE cząsteczki organiczne?

Strona 36: „Gdy przyłożone zostaje zewnętrzne źródła napięcia, na granicy faz powstają dwie warstwy jonów o przeciwnym znaku ładunków – jedna na powierzchni elektrody druga zaś od strony elektrolitu, składająca się z solwatowanych jonów – Zasadniczy błąd. Podwójna warstwa elektryczna formuje się spontanicznie jako skutek separacji ładunków kiedy otoczenie we wszystkich kierunkach nie jest identyczne

Strona 45. Bakteryjne FAD - GDH zaprezentowana na stronie 45 jest tylko jednym z tego rodzaju. Jest co najmniej kilka innych bakteryjnych FAD-GDH niekoniecznie zawierających klaster Fe-S. Część pracy dotycząca utleniania glukozy nie jest dobrze napisana.

Strona 54 ”celuloza w komórkach daje wzmocnienie w formie stelaża w drzewach, roślinach, algach i innych osobnikach morskich (np. tunikatach) [133]. W algach większa część komórki jest zbudowana z innych polisacharydów niż celuloza.

Strona 55. Brakuje odnośnika do legendy Rys. 27.

Strona 58, wiersz 3: „and the polimer that has already formed to their radical cation form [160]. Proszę sformułować to zdanie inaczej.

Strona 61, wiersz 14: „usprawnione parametry kinetyczne i termodynamiczne. Co to są zdaniem autora zwiększone parametry termodynamiczne i jak można je uzyskać stosując nanocząstki złota?

Strona 63, wiersz 11-12: „przepływa przez przeciwelektrodę, która jest wykonana z inertnego elektrochemicznie metalu (platyna, złoto, węgiel szklisty)”. Węgiel szklisty nie jest metalem.

Wiersz 15-16: „Potencjał elektrody referencyjnej jest zazwyczaj związany ze standardowym potencjałem elektrody wodorowej, który został wybrany jako wartość zerowa”. Zazwyczaj?

Wiersz 16-18: „Gdy pomiar jest wykonywany w układzie pozbawionym elektrody referencyjnej, zazwyczaj katoda jest włączana w obwód jako elektroda pracująca, anoda zaś jako połączona elektroda referencyjna i pomocnicza”. Proszę wyjaśnić.

Strona 64, wiersz 11-13: „Technika umożliwia analizę „wymiaru potencjałowego” kinetyki enzymatycznej, co sprzyja analizie kompleksowych enzymów wielocentrowych.” Proszę o wyjaśnienie.

Strona 65, wiersz 8: „takie same dla każdego centrum redoks jeśli enzym zawiera ich kilka”, To jest błąd! Na przykład, powierzchnia pod pikiem FAD (gdyby był zauważalny dla FDH) powinien być dwa razy większy niż dla każdej grupy hemowej, biorąc pod uwagę, że reakcja FAD/FADH<sub>2</sub> angażuje 2 protony i 2 elektrony, hem jeden elektron; porównaj dla CDH w C. Schulz, R. Kittl. R. Ludwig, L. Gorton, *ACS Catalysis*, 6 (2016) 555–563. **Direct electron transfer from the FAD containing dehydrogenase domain of cellobiose dehydrogenase to electrodes.**

Strona 67, wiersz 4-7: Są dwie dobrze opisane i rozwinięte techniki służące kontroli transportu masy: pierwsza, poprzez wirowanie elektrody aby uzyskać kontrolę hydrodynamiczną; druga poprzez zastosowanie mikroelektrod, gdzie dyfuzja ma charakter radialny.” To zdanie jest niekompletne. Użycie przepływu przez celę pomiarową o zdefiniowanym profilu przepływu (*wall jet cell*) może być wykorzystane by uzyskać te same rezultaty co na RDE: J. Yamada, H. Matsuda, Limiting diffusion currents in hydrodynamic voltammetry: III. Wall jet electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 44 (1973) 189-198.

Wiersz 5 niżej: „krok na tyle szybki aby przeniesienie ładunku nie stanowiło czynnika limitującego”. Jaki wówczas etap będzie czynnikiem limitującym szybkość?

Strona 70 zaczyna się opisem elektrochemii elektrody wirującej w roztworze zawierającym depolaryzator rozpuszczony w roztworze. Nagle jednak, wraz z równaniem (41) elektroda wirująca jest już zmodyfikowana enzymem. Ten skok w rozumowaniu powinien zostać poprawiony.

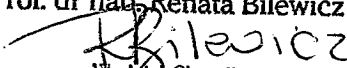
Proszę poprawić równanie (45).

Strona 72, wiersz 8-10: W różnicowej woltamperometrii pulsowej, ustalona wielkość pulsu nałożona na liniowy wzrost potencjału jest przykładana do elektrody pracującej w momencie zaraz przed zakończeniem spadku.” Jaki spadek jest omawiany? Odnoszę wrażenie, że autor zmieszał opis z klasyczną DME (kapiącą elektrodą rtęciową).

Strona 73, wiersz 6-8: „DPV jest przydatną techniką do pomiarów śladowych zawartości populacji związków organicznych i nieorganicznych o nanomolowych stężeniach.” Po co jest to tu wspomniane?

Strona 79: Zdefiniuj  $f_0$ .

Zgodność z wersją oryginalną poświadcza

Prof. dr hab. Renata Bilewicz  
  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Warszawski  
Pasteura 1. 02-093 Warszawa