



Wydział Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego
Prof. dr hab. Renata Bilewicz

5-09-2017, Warszawa.

Recenzja rozprawy doktorskiej
Magister inż. Agnieszki Jędrychowskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Jędrychowskiej p.t. „Badania aktywności biokatalizatorów unieruchomionych w zorganizowanych warstwach do zastosowań w konstruowaniu bioczujników” została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Jadwigi Sołoducho.

Rozwój gospodarki i przemysłu przynosi ogromne zapotrzebowanie na stałe monitorowanie naszego otoczenia i sprawdzanie, czy nie są wytwarzane w nadmiarze substancje szkodzące środowisku i człowiekowi. Recenzowana praca dotyczy bardzo aktualnej tematyki – czujników do analizy związków fenolowych. Ich rozpowszechnienie w środowisku człowieka i często toksyczny charakter wymagają czułych i selektywnych metod oznaczania. Metod jest wiele, ale rzadko mogą być stosowane *in situ*. Do tego typu pomiarów najlepiej nadają się właśnie metody wykorzystujące czujniki. Biosensory są interesującą alternatywą w oznaczaniu ważnych bioanalitów, także ze względu na niski koszt jednostkowy analizy, krótszy czas analizy i możliwości miniaturyzacji. Z drugiej strony opracowanie biosensora o pożądanym parametrach użytkowych nie jest łatwe i właściwie jedynym naprawdę handlowo rozpowszechnionym na świecie analizatorem tego typu jest czujnik glukozy. Prognozy Global Market Insights dla rynku biosensorów na 2024r. to 29.6mld USD, co dobrze podsumowuje wagę tej tematyki i zachęca do jej podejmowania. Zainteresowanie doktorantki biosensorem do oznaczania związków fenolowych mieści się więc, jak widać, w głównych trendach współczesnej chemii analitycznej.

Układ pracy doktorskiej mgr Jędrychowskiej jest klasyczny: Wstęp, Przegląd literatury (23 strony); Metodyka badań (10 stron); Wyniki i dyskusja (70 stron); Wnioski i Podsumowanie, a na końcu Literatura (214 pozycji) i omówienie własnego dorobku naukowego.

We wstępie, mgr Agnieszka Jędrychowska uzasadnia wybór tematyki pracy doktorskiej i określa jej cele. Czujniki związków fenolowych planuje konstruować wykorzystując katalizatory biologiczne - enzymy z grupy oksydoreduktaz, a nacisk w pracy kładzie na istotnie najważniejszy problem – jak optymalnie związać enzym z podłożem przewodzącym. Głównym celem pracy jest znalezienie odpowiednich układów organicznych o charakterze półprzewodnikowym i opracowanie sposobu ich osadzenia w formie cienkiej warstwy, pełniącej rolę łącznika enzymu z elektrodą i jednocześnie zapewniającego swobodny przepływ elektronów. Do realizacji tego zadania Autorka wykorzystwała szereg metod: tzw. spin-coating, metodę Langmuira – Blodgett i elektropolimeryzację. Skomplikowanym zadaniem było też związanie enzymu z matrycą, gdyż każdy z gamy badanych związków heterocyklicznych posiadał inne właściwości, budowę i ładunek i w celu stabilnego związania enzymu należało wybrać odpowiednią metodę: adsorpcji fizycznej czy chemicznej, wiązania kowalencyjnego, a czasem elektroosadzania. Jest więc w tej pracy, wiele wątków, wymagających od doktorantki dużych zdolności eksperymentalnych i jednocześnie innowacyjnego spojrzenia na układ wybrany do badań.

W przeglądzie literaturowym Pani mgr Jędrychowska wyczerpująco przedstawiła budowę biosensorów enzymatycznych, parametry je charakteryzujące, enzymy, które stosuje się jako katalizatory oraz mechanizmy transportu elektronów w warstwach enzymatycznych. Omawiając mechanizm DET – bezpośredniego transportu elektronów warto było już tutaj poświęcić więcej uwagi drugiemu mechanizmowi, czyli MET – mediowanemu transportowi elektronowemu, gdyż jego zastosowania są jeszcze obecnie dużo szersze, a uzyskiwane prądy katalityczne wyższe. Doktorantka powraca do nich szerzej w rozdziale poświęconym warstwom przewodzącym w biosensorach. Autorka podkreśliła niezwykłą odporność tyrozynazy, jako biokatalizatora, na temperaturę oraz pH i rozpuszczalniki organiczne, co zwykle skłania do wykorzystania tego enzymu w czujnikach. Mniej popularna jest lakaza, która jest także przedmiotem zainteresowania Doktorantki.

Doktorantka wybiera biosensory elektrochemiczne i optyczne wśród różnych metod detekcji oddziaływania enzymu i analitu. Najwięcej uwagi poświęca czujnikom amperometrycznym. Ostatnio sporo uwagi poświęca się też metodom impedancyjnym oraz piezoelektrycznym. Autorka podaje bezpośrednie i pośrednie metody, ale tylko w kontekście sensorów optycznych, które uważa za szczególnie interesującą alternatywę w detekcji analitów. Podając wybrane przykłady stosowanych biosensorów enzymatycznych logicznie dzieli je według obszarów zastosowań: medycyny, ochrony środowiska i przemysłu spożywczego. Nie omawia dokładniej medycznie najbardziej się rozwijających glukometrów, a tam właśnie postęp w dziedzinie jest najwyraźniejszy, wręcz skokowy, jeśli rozważać sposoby detekcji, ilość i rodzaj płynu ustrojowego oraz sposób umieszczenia czujnika. W rozdziale 2.2 Doktorantka dyskutuje już bardziej szczegółowo różne warstwy przewodzące, sposoby ich nakładania na podłoża oraz mechanizmy przekazywania ładunku w biosensorach różnych generacji. Materiał przedstawiony jest przejrzysty, brakuje mi tylko wypunktowania nie tylko zalet, ale i wad poszczególnych podejść np. faktu, że sensory drugiej generacji mogą tracić mediator w czasie pracy lub, że sensory trzeciej generacji mają zwykle gorszą czułość i prądy katalityczne są zawsze niższe niż w przypadku procesów mediowanych. Z kolei polimeryzacji czasem towarzyszy utrata natywnej struktury białka i częściowa utrata aktywności enzymów, a adsorpcyjne wiązanie enzymu może nie być zbyt trwałe, zaś kowalencyjne - mało wydajne. Nie są wolne od tego typu problemów omawiane warstwy Langmuira-Blodgett, czy Schaefera; często występują trudności w stabilnym umocowaniu rozpuszczalnego w wodzie enzymu, co szczególnie widać przy dłuższym używaniu sensora. Omówienie metod badania cienkich warstw w tej części pracy jest krótkie. Metodę refleksyjno-absorpcyjną nazwałabym odbiciowo-absorpcyjną, gdyż, z po polsku rozumianą refleksją, nie ma ona wiele wspólnego.

W rozdziale 3 mgr. Jędrychowska omawia odczynniki, aparaturę, metody przygotowania i modyfikacji podłoży szklanych, z tlenku indowo-cynowego i platynowych. Opis jest klarowny jedynie brakuje czasem wyjaśnienia, co oznacza skrót lub metoda obdarzona nazwiskiem np. ITO, czy roztwór Irayamy. Nie każdy czytający pracę jest przecież takim specjalistą w dziedzinie, jak Autorka pracy doktorskiej. Ciekawa jest modyfikacja metody Langmuira-Schaefera używana do nakładania warstw monomolekularnych z pomocą pompy i rurki, umożliwiającą pokrycie od razu całej

powierzchni podłoża. Jedynie rysunek wyjaśniający tę modyfikację metody L-S nie jest jasny, bo płytka, na którą przenosi się warstwę musi być chyba na wysokości barier, inaczej przy obniżaniu poziomu cieczy warstwa uległaby destrukcji. Zakładam, że bariery są sztywno umieszczone, jak to zwykle ma miejsce w instrumentach L-B. Wypróbuję sama tę metodę w trudnych przypadkach!

Metody unieruchamiania biokatalizatorów na podłożach stałych omówione są bardzo przejrzyście, podobnie jak pomiary aktywności metodą spektrofotometryczną i elektrochemiczną. Szczegółowo przedstawiono też modele bioczuJNIKA optycznego.

Dyskusja wyników eksperymentalnych uporządkowana jest logicznie - według grup związków wykorzystanych do polimeryzacji. Jedynie woltamogramy cykliczne budzą moją wątpliwość – powinno się je zaczynać od potencjału, przy którym nie zachodzi żaden proces elektrodowy, czyli mierzony prąd jest zerowy. Tymczasem, na schemacie 16 zarówno ABTS jak i hydrochinon przy potencjale początkowym (odpowiednio +1.1V i +0.8V) ulegają już utlenieniu i nie kontrolujemy ilości produktu utworzonego przy elektrodzie. Znacznie lepszą kontrolę dałby wybór potencjału początkowego odpowiednio -0.2 oraz -0.3V – wtedy startowano by z zerowej wartości prądu. W podpisach rysunków np. 19 i 20 warto podawać stężenia substratów reakcji w roztworze.

Rzetelnie przeprowadzone badania pozwoliły wybrać kopolimer 6 i lakazę, jako modyfikatory sensora aminofenolu i katecholu, natomiast dla fenolu był to układ niewłaściwy. Bardzo podobało mi się równoległe badanie aktywności enzymów unieruchomionych na powierzchni elektrod metodą spektrofotometryczną, często prostszą od metody elektrochemicznej. Szczególnie w przypadku elektroosadzania enzymów na warstwie polimeru, kiedy właściwie trudno powiedzieć, co się dzieje z samym enzymem po przyłożeniu do elektrody potencjału. Metoda EDS wydaje się też lepsza, niż metoda wzrostu grubości warstwy na potwierdzenie unieruchomienia enzymu, gdyż jak widać z obrazów SEM czy AFM, nie jest to warstwa jednorodna. Pewnie lepsza byłaby metoda mikrowagi kwarcowej – wtedy oceniano by przyrost masy na elektrodzie. Metoda spin-coating prowadzące do grubszych warstw niż Langmuira – Blodgett były korzystniejsze z punktu widzenia trwałości pokryw. Dla tyrozynazy, interesującym podkładem polimerowym były odpowiednie pochodne selenowe. Piki woltametryczne widoczne na schematach 53 i 54 są prawdopodobnie

związane z katecholem i DOPą, a nie z samą tyrozynazą – należało dołączyć elektrochemię białka bez tych substratów przed uznaniem, że mierząc potencjały pików uzyskujemy potencjał formalny enzymu (str. 76). Sensor wykorzystujący tyrozynazę i polimer 10 okazał się bardzo korzystnym do oznaczania katecholu i został opisany w publikacji w *Electroanalysis*. Powód, dla którego selenofenowe pochodne są wyraźnie lepsze od innych wart jest szerszego komentarza w pracy. Nie rozumiem, co Autorka ma na myśli pisząc, w części poświęconej pomiarom elektrochemicznym, o tworzeniu się i wzroście szerokich pasm o niższym potencjale (ostatnie linie na stronie 81). W owocnych badaniach sensorów wykorzystujących pochodne akrydonu i lakazę Cerrena unicolor pomyłono chyba potencjały formalne enzymu z potencjałem pary chinon/hydrochinon. Potencjał formalny enzymu uzyskamy tylko w pomiarze elektrochemicznym bez obecności hydrochinonu – w obecności chinonu obserwujemy elektrochemię pary chinon/hydrochinon, która zresztą może pełnić rolę mediatora dla tego enzymu. Wtedy proces elektrodowy opisuje się przy potencjale mediatora, a nie formalnym enzymu, (który zwykle jest bardziej dodatni). Zresztą, Autorka sama to stwierdza prowadząc eksperyment bez mediatora, ale z tlenem i ta samą lakazą – proces przebiega przy potencjale 0.5V, nie ma chinonów, a potencjał jest właśnie bardzo bliski potencjałowi formalnemu samej lakazy.

Autorka zbadała także przydatność tetrafenylosilanu, a także złożonych układów zawierających w cząsteczce polimeru fragment donorowy i akceptorowy połączone tiofenem, zawsze kończąc badania powstałego sensora obrazowaniem topografii metodą SEM/AFM oraz badając zmiany aktywności unieruchomionego enzymu w czasie metodą spektrofotometryczną w obecności ABTS. Pochodne akrydonu Doktorantka wykorzystwała do tworzenia warstw Langmuira i próbowała w unieruchomić na nich różnymi metodami lakazę. Naniesienie na uporządkowaną warstwę przy wysokim ciśnieniu dało efekt najlepszy, jednakże nie można uchronić się w ten sposób od desorpcji enzymu i metoda przegrywała z innymi sposobami konstrukcji sensora. Pracę kończy opis modelu bioczuJNIKA optycznego z wykorzystaniem najlepszych, zdaniem Autorki warstw polimerowych. Pod względem czasu odpowiedzi i czułości, bioczuJNIKI tego typu najlepiej nadawały się do pracy w układach przepływowych..

Wnioski z pracy opisane są w formie 8 punktów na 10 stronach, ale są raczej zbyt długim streszczeniem całej pracy i brakuje wniosku najważniejszego, który z czujników i dlaczego zdaniem Autorki jest najlepszy i godny polecenia analitykom. Który z modyfikatorów podłoża o charakterze półprzewodnikowym jest najkorzystniejszy i jaka metoda unieruchomienia enzymu na modyfikatorze okazała się metoda godną polecenia w praktycznych zastosowaniach sensora. Nie przedyskutowano też walorów wybranego czujnika w porównaniu z innymi opisanymi w literaturze dla związków fenolowych. Z pewnością bardzo obiecujące są zaproponowane sensory optyczne pracujące w przepływie. Wykorzystano je na razie do oznaczania ABTS, ale z pewnością warte są wypróbowania w rzeczywistych pomiarach fenoli w próbkach wód środowiskowych

Drobne uwagi:

1. Słowo „zimmobilizaowana” często powtarzające się w pracy warto zastąpić słowem „unieruchomiona”
2. W przypadku pików woltametrycznych nie używamy pojęcia intensywność pików (str. 59) tylko prąd pików.
3. Zamiast przyłączania biokatalizatora do macierzy stosowałabym raczej pojęcie przyłączania do matrycy, lub do warstwy polimeru.

Podsumowując pracę doktorską pani mgr Agnieszki Jędrzychowskiej uważam, że jest to wartościowy wkład w dziedzinie czujników, wykorzystujących warstwy polimerowe i enzymy, jako katalizatory utleniania związków fenolowych. Imponujący jest rozmiar wykonanej pracy mierzony bogactwem przebadanych związków, testowanych jako modyfikatory elektrod oraz rzetelnie prowadzonymi badaniami optymalnego sposobu unieruchomienia obu enzymów. Obiecujący jest także zaproponowany czujnik optyczny do pracy w warunkach przepływowych.

Mgr Agnieszka Jędrzychowska jest współautorką 11 publikacji naukowych w tym 7 prac posiada współczynnik IF, wszystkie prace zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Jest współautorką 9 patentów oraz 2 zgłoszeń patentowych. Doktorantka przedstawiała wyniki swoich badań w 21 komunikatach konferencyjnych Jest też kierownikiem projektu NCN Preludium. Cały dorobek naukowy, praca

doktorska, działalność naukowa, uzyskane nagrody i stypendia potwierdzają, że jest to wyróżniający się młody, ale już ze sporym doświadczeniem, pracownik naukowy.

W oparciu o przeprowadzoną analizę rozprawy stwierdzam, że praca mgr inż. Agnieszki Jedrychowskiej spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wkład doktorantki w rozwój czujników elektrochemicznych oraz optycznych wykorzystujących enzymy uważam za znaczący i dlatego wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'R' followed by 'Bilewicz'.

Renata Bilewicz