



UNIwersYTET
WARszAWSKI

Wydział Chemii



Warszawa, 22.02.2019

dr hab. Andrzej Kudelski, prof. ucz.
Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
e-mail: akudel@chem.uw.edu.pl
tel: 22 55 26 401
FAX: 22 55 26 434

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Renaty Wojnarowskiej-Nowak pod tytułem:
„Bionanokompleksy nanocząstek złota z enzymami – zastosowanie w biosensorach”
wykonanej pod kierunkiem prof. dra. hab. Eugeniusza Szeregija**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Renaty Wojnarowskiej-Nowak została przygotowana pod kierunkiem naukowym prof. dra. hab. Eugeniusza Szeregija. Na podstawie podziękowań umieszczonych w rozprawie można stwierdzić, że praca ta została wykonana w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk, Uniwersytecie Rzeszowskim oraz w Jackson State University. Celem pracy doktorskiej mgr Renaty Wojnarowskiej-Nowak była optymalizacja sposobu otrzymywania nanokompleksów w postaci nanocząstek złota, na których efektywnie unieruchomiono oksydazę cholesterolową. Oksydaza cholesterolowa jest ważnym enzymem analitycznym wykorzystywanym między innymi w oznaczaniu cholesterolu. Uważam, że mgr Wojnarowska-Nowak wybrała bardzo ciekawy temat do swoich badań i że jej praca dobrze wpisuje się w nowoczesny nurt badań dotyczący syntezy nowych biomateriałów, który prowadzony jest w wielu laboratoriach na świecie. Analizowany problem jest niewątpliwie ciekawy z naukowego punktu widzenia, warto jednak również podkreślić, że uzyskane wyniki mogą okazać się także przydatne dla grup zajmujących się praktycznymi zastosowaniami oksydazy cholesterolowej do konstrukcji różnego rodzaju sensorów enzymatycznych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 129 stron i zawiera 146 odsyłaczy literaturowych. Rozprawa ma układ klasyczny. W pierwszej kolejności zostało umieszczone streszczenie, które dobrze oddaje treść dysertacji. Szkoda tylko, że ograniczono się jedynie do polskiej wersji streszczenia nie umieszczając również wersji w języku angielskim. W następnym rozdziale opisano mechanizm wzmocnienia w powierzchniowo wzmocnionym rozpraszaniu ramanowskim (SERS), przedstawiono sposoby tworzenia bionanokompleksów oraz opisano biosensory oparte na nanomateriałach, objaśniając także

podstawowe zasady ich funkcjonowania. Rozdział ten został przygotowany w sposób bardzo ciekawy i przeczytałem go z ogromnym zainteresowaniem. Do tego rozdziału mam tylko następujące niewielkie uwagi. Według mnie nienajlepszym rozwiązaniem było zastosowanie we wzorze przedstawionym na rysunku 1.3 (strona 14) innych symboli do oznaczenia natężenia pola elektrycznego niż symbole wykorzystywane w tekście. Nie do końca zgadzam się również ze stwierdzeniem ze strony 15, że „szacuje się, że mechanizm elektromagnetyczny prowadzi do wzmocnienia sygnału ramanowskiego na poziomie 10^{10} - 10^{11} [12].” W moim odczuciu takie stwierdzenie sugeruje, że średnia wartość elektromagnetycznego współczynnika wzmocnienia SERS ma właśnie wartość rzędu 10^{10} - 10^{11} , zaś w rzeczywistości tak duże współczynniki wzmocnienia obserwuje się jedynie na pewnych szczególnie aktywnych miejscach na podłożach do pomiarów SERS, przy uśrednionych współczynnikach wzmocnienia SERS o około 3, 4 rzędy wielkości mniejszych. Wspominając o spektroskopii ramanowskiej (patrz strona 16) „bazuje na spektroskopii rozproszenia ramanowskiego, w której badane są przejścia pomiędzy poziomami oscylacyjnymi lub rotacyjnymi cząsteczki [24]” warto byłoby również dodać informację, że przy pomocy spektroskopii ramanowskiej można również badać przejścia pomiędzy poziomami elektronowymi. Stwierdzenie ze strony 17, że „warunkiem koniecznym dla zajścia efektu Ramana jest zmiana polaryzowalności w trakcie drgania normalnego cząsteczki” trzeba uściślić – będę wdzięczny jeśli mgr Wojnarowska-Nowak zrobi to w trakcie obrony swojej pracy doktorskiej. Nie do końca zgadzam się również z innym stwierdzeniem ze strony 17, że „pod względem wykorzystywanych materiałów najczęściej przygotowywane są podłoża ze złota lub srebra, rzadziej z miedzi i platyny (ze względu na łatwość utleniania ich powierzchni)”. Platyna jest raczej bardzo odporna na utlenianie, tak więc to, że platyna jest rzeczywiście nieczęsto wykorzystywana jako materiał do pomiarów SERS wiąże się z tym, że na nanoustrukturyzowanej platynie osiąga się relatywnie małe współczynniki wzmocnienia widma SERS.

W kolejnym rozdziale mgr Wojnarowska-Nowak w jasny sposób opisuje jaki problem badawczy zamierza rozwiązać. Do tego rozdziału mam tylko jedną drobną uwagę, że podając wartość typowego przekroju czynnego na rozpraszanie ramanowskie (10^{-30} cm²) warto byłoby wspomnieć, że podana wartość dotyczy przekroju czynnego dla pojedynczej molekuly. W trzecim rozdziale dotyczącym technologii wytwarzania bionanokompleksów i opisu metod ich charakterystyki zaczyna się już pojawiać opis eksperymentów wykonanych przez mgr Wojnarowską-Nowak. Według mnie opis procedur eksperymentach oraz aparatury badawczej wykorzystywanej do pomiarów jest wyczerpujący i na podstawie dostarczonych danych będzie można bez problemu powtórzyć przedstawione eksperymenty. Również kolejne części dysertacji, w których opisano uzyskane wyniki, to jest opis właściwości strukturalnych i biochemicznych uzyskanych kompleksów oraz analiza ich widm FTIR i SERS są napisane w sposób przejrzysty. W tej części pracy znajdują się również symulacje rozkładu pola elektrycznego wokół nanocząstek złota, na które pada fala elektromagnetyczna.

Głównym osiągnięciem przedłożonej mi do recenzji rozprawy doktorskiej jest bardziej szczegółowe określenie sposobu, w jaki najlepiej jest uzyskać kompozyt nanocząstki złota - oksydaza cholesterolowa, który będzie miał jak najlepsze właściwości do wybranych zastosowań praktycznych. Pokazano, że wskazane jest zastosowanie warstwy łącznikowej

otrzymanej z podstawionego alkanotiolu o relatywnie długim łańcuchu węglowym. Oczywiście dojście do tego wniosku zostało poprzedzone zbadaniem wielu innych układów i wymagało wykonania dużej liczby eksperymentów. Jak wspomniano powyżej, obserwacja ta może okazać się istotna dla badaczy zajmujących się praktyczną konstrukcją sensorów wykorzystujących oksydazę cholesterolową. Reasumując, wyniki uzyskane przez mgr Renatę Wojnarowską-Nowak są ciekawe, dobrze udokumentowane, tak więc, wartość merytoryczną tej rozprawy doktorskiej oceniam wysoko.

Do części doktoratu, w której mgr Renata Wojnarowska-Nowak przedstawia wyniki własnych eksperymentów mam tylko dwa pytania i jedną drobną uwagę. Na stronie 60 Autorka napisała: „*Zmiana częstotliwości plazmonowej bionanokompleksów w odniesieniu do nagich nanocząstek jest również wynikiem obecności dodatkowej otoczki na powierzchni nanocząstek. Skutkiem tego jest przeniesienie części elektronów z AuNP na ligand [116], co oznacza zmniejszenie koncentracji elektronów w macierzy AuNP, a zarazem zmniejszenie częstotliwości plazmonowej zgodnie z wyrażeniem 1.1*”. Czy przy wyjaśnianiu przyczyn przesunięcia pasma plazmonowego ku większym długościom fali nie należałoby również uwzględnić zmiany przenikalności elektrycznej otoczenia nanocząstek plazmonicznych wywołanej adsorpcją białka?

Na stronie 58 Autorka napisała, że Rysunek 4.5 przedstawia „*wynik pomiaru absorpcji optycznej w zakresie widzialnym dla wytworzonych AuNPs*”. Czy w tym przypadku nie należałoby jednak napisać, że rysunek ten przedstawia wynik pomiaru ekstynkcji zolu nanocząstek złota?

Moja wspomniana powyżej uwaga krytyczna, od razu chcę jednak podkreślić, że nie kwestionująca poprawności określenia struktury tworzonych kompleksów, dotyczy przypisania pasma przy 528 cm^{-1} w widmie FTIR do drgań wiązania Au-S (patrz strony 68 i 69). Magister Wojnarowska-Nowak oparła to przypisanie na pozycji literaturowej 119 (A. Thamri i współpracownicy, Sci. Rep., 2016, 6, 35130). Rzeczywiście, w pozycji 119 proponuje się nawet, że pasmo od drgania rozciągającego Au-S pojawia się aż przy 760 cm^{-1} , ale według mnie nie jest to wielkość akceptowana przez znaczącą część specjalistów. W moim odczuciu o wiele bardziej wiarygodne są badania, w których liczba falowa pasma przypisywanego temu drganiu jest ustalona jako mniej więcej jedna trzecia / połowa wartości podanej przez mgr Wojnarowską-Nowak (na przykład patrz B. Varnholt i współpracownicy, J. Phys. Chem. C, 2014, 118, 9604–9611).

Po koniec przedłożonej mi do recenzji rozprawy doktorskiej znajduje się rozdział „wnioski końcowe”, w którym, w sposób syntetyczny mgr Wojnarowska-Nowak pokrótce przedstawiła najistotniejsze z uzyskanych wyników. Po tym rozdziale umieszczone spis rysunków, spis tabel oraz spis cytowanej literatury.

Praca napisana jest ładnym, przystępnym językiem. Redakcja pracy jest relatywnie staranna, znalazłem jedynie kilka literówek takich jak: „*zdolności generowanie rezonansu*” czy też „*będzie mogło być wykorzystywany*” (oba przykłady ze strony 30), „*wykorzystując falę elektromagnetyczną*” (strona 64), „*pozostałe pasm*” (strona 77), „*widma posiada silne pasma*” (strona 86), „*potwierdziły obecność licznych pasma*” (strona 94), „*z wykorzystanie dwóch różnych długości fali*” (strona 104). W niektórych przypadkach zrobienie literówki

skutkowało utworzeniem wyrazu o innym znaczeniu, na przykład, na stronie 66 wspomina się o likierach zamiast linkerach, zaś na stronie 31 zamiast wyrazu „tworzą” jest wyraz „twarzą”.

W podpisach do rysunków 6.4 i 6.5 (patrz strona 93) brakuje zaznaczenia, która część podpisu odnosi się do widma oznaczonego na wykresie literą (c).

Warto również wspomnieć o tym, że w pewnych częściach recenzowanego doktoratu jako separator dziesiętny jest prawidłowo używany przecinek, w innych zaś miejscach jest błędnie wykorzystywana kropka (na przykład na stronach 85 i 86). W niektórych przypadkach nawet na jednej stronie występują oba sposoby zapisu separatora dziesiętnego, ma to miejsce na stronie 36, 39 czy też 41.

Wszystkie wymienione powyżej drobne uchybienia nie wpływają jednak na moją wysoką ocenę przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. Nie mam wątpliwości, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w zakresie chemii, tak więc, przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882 i 1311). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Renaty Wojnarowskiej-Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Andrzej Kudelski, prof. ucz.