

Prof dr hab. Zofia Stępniewska
Katedra Biochemii i Chemii Środowiska
Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Ul. Konstantynów 1 I
20-708 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Kamili Wlizio pt. "Synteza substancji barwnych w procesie biokatalizy i ocena ich właściwości" wykonanej pod kierunkim dr hab Anny Jarosz-Wilkoszkiej, prof.UMCS w Zakładzie Biochemii Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS, współfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Preludium 9 (2015/17/N/NZ9/03647), projektu 40 (NN 302 633040) oraz projektu luventus PLUS (0433/IPI/2011/71)

Zapotrzebowanie na barwniki przejawiał człowiek od czasów prehistorycznych. Szacuje się, że najstarsze kolorowe ryciny, pozostawione w jaskiniach Altamira w północnej Hiszpanii oraz w południowej Francji w Lascaux, posiadają nawet 20 tysięcy lat. Materiałami barwiącymi były zastosowane nieorganiczne pigmenty, które występują naturalnie w postaci kredy, rud żelazowych i manganowych czy glinokrzemianów. Natomiast wykorzystanie materiałów pochodzenia roślinnego i zwierzęcego do barwienia różnych włókien stanowiło niełada sztukę w Japonii, Chinach, Indiach czy starożytnym Egipcie już 4 tysiące lat p.n.e. Zasadniczym przełomem w technice barwienia było otrzymanie barwników syntetycznych w XIX wieku. Jednej z pierwszych syntez barwnika czerwonego (fuksyny) dokonał w 1855 roku polski chemik Jakub Natanson. Odkrycie nowych związków chemicznych mających zdolność trwałego zabarwiania różnych materiałów inspirowało badaczy przez stulecia. Obecnie lista zawiera 4000 substancji barwnych, wśród których połowę stanowią barwniki azowe. Wykazano, że związki te o ile nie są dostatecznie silnie związane z włóknami, gdy dostaną się do organizmu, mogą podlegać rozkładowi w jelicie, wątrobie i prawdopodobnie w bakteriach na skórze, wydzielając aromatyczne aminy o silnym działaniu kancerogennym i mutagennym. Wiele badań nad zdrowotnością wskazuje, że stosowanie ogromnej ilości związków syntetycznych w bezpośrednim otoczeniu człowieka, jak: odzież, żywność, wyposażenie wnętrz, sprawia zwiększone ryzyko zachorowań. Rosnące wciąż zapotrzebowanie przemysłu tekstylnego na barwniki naturalne, przyjazne człowiekowi, nie wykazujące efektów

ubocznych jak przewlekłe alergie czy podrażnienia skóry skłaniają badaczy do śmiałych poszukiwań w zakresie biotechnologii nad opracowaniem prostych metod pozyskiwania tych związków z udziałem biokatalizatorów. Takim właśnie zagadnieniem poświęcona jest oceniana praca doktorska, której celem była biosynteza barwnego produktu z wykorzystaniem lakazy grzybowej i określenie jego właściwości.

Przedstawiona do oceny praca składa się z 200 stron, 33 Tabel i 57 rysunków. Wyodrębniono w niej 11 rozdziałów, zamieszczono Wnioski, Wyniki przedstawionej do oceny pracy w postaci publikacji i referatów konferencyjnych, dorobek naukowy, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię.

Część doświadczalna pracy składa się z kilku etapów, w których wytypowano substrat do biosyntezy oraz organizm grzybowy, wytwarzający odpowiedni enzym, pełniący rolę biokatalizatora procesu czyli lakazę. W następnej części pracy autorka podjęła się trudnego zadania jakim była optymalizacja biosyntezy barwnika. Dobierając kolejno parametry podłoża hodowlanego, składników odżywczych, odczynu, pojemności buforowej środowiska reakcji oraz temperatury osiągnęła wiedzę na temat hodowli grzybowych, które realizowane były na podłożu stałym, z unieruchomioną biomasą grzybową oraz w hodowlach wytrząsanych. Podążając dalej usiłowała unieruchomić lakazę grzybową na nośnikach porowatych, wykorzystując do tego celu dwa materiały akrylowe, jeden wiążący lakazę kowalencyjnie z grupami aminowymi w drugim zaś tworzyły się oddziaływania wodorowe z łańcuchami węglowodorowymi nośnika oraz materiału styrenowego makroporowatego o wysyczonej powierzchni oddziaływań. Testując stopień unieruchamiania lakazy na badanych materiałach i jej aktywność, możliwe było wyłonienie optymalnego nośnika, służącego do wydajnego procesu immobilizacji enzymu. W celu zwiększenia stabilności unieruchomionej lakazy poddano układ testowaniu w buforach o różnym składzie i wartościach pH. Przeprowadzono również test na termostabilność immobilizowanego enzymu w szerokim zakresie temperatur od 40 do 80 °C.

Autorka pracy zbadała właściwości uzyskanego drogą biosyntezy barwnika i wyznaczyła jego parametry kinetyczne stosując oczyszczoną lakazę z *Pleurotus ostreatus*. Podjęła również zadanie technologiczne związane z barwieniem naturalnych włókien pochodzenia roślinnego (bawełna i len) oraz zwierzęcego (wełna i jedwab). Z wielką starannością przeprowadziła tę część badań, we współpracy z wyspecjalizowanym laboratorium analiz włókienniczych TKANLAB w Łodzi, gdzie określono trwałość badanego barwnika związanego z różnymi tkaninami. Pomyślnie

zakończone testy na działanie różnych czynników jak: światło, tarcie mechaniczne, pot, wykazały potencjalną przydatność uzyskanego barwnika do celów tekstylnych.

Pozostała część interesującej pracy związana była z określeniem natury uzyskanego drogą biosyntezy barwnika. W tym celu przeprowadzono rozdział chromatograficzny na żelu krzemionkowym, wykazując poza produktem głównym obecność jeszcze dwóch innych produktów towarzyszących podstawowemu. Stosując wówczas kolumnową chromatografię preparatywną możliwe było pozyskanie formy głównej N15C, zawartej w początkowych frakcjach 1-3. obecność form pośrednich, N15 A w następnych frakcjach 5-6 oraz N15 D we frakcjach 7-12. Każdy z uzyskanych produktów barwnych posiadał własne charakterystyczne widmo z maksimum absorpcji przypadającymi kolejno przy 440, 470, 450 nm oraz czas retencji. Bliskie sąsiedztwo maksimum absorpcji poszczególnych frakcji wskazywało na obecność zbliżonych grup chromatoforowych. Uzyskany drogą biosyntezy barwnik posiadał charakter polarny, dlatego też dobrze rozpuszczał się w wodzie i metanolu, słabiej w etanolu, nie wykazując rozpuszczalności w rozpuszczalnikach niepolarnych takich jak aceton, chloroform czy octan etylu.

Niezwykle ambitne zadanie, które podjęła autorka pracy, polegało na wyznaczeniu masy cząsteczkowej uzyskanego barwnika, określenie jego formuły chemicznej i struktury. Przebiegło ono pomyślnie we współpracy z włoskim Uniwersytetem w Sienie. Wobec uzyskanego obrazu barwnika N15 zaproponowano strukturę fenazynową, o wzorze sumarycznym $C_{22}H_{15}N_3O_8$, masie cząsteczkowej 449. W budowie strukturalnej barwnika można było wyodrębnić dwa fragmenty, jeden złożony z trzech skondensowanych sześciocząłonowych pierścieni, z których środkowy w swojej strukturze posiada dwa hetero atomy azotu w położeniu –para, połączone z jeszcze jednym pierścieniem aromatycznym poprzez mostek iminowy –NH–. Cząsteczka wyizolowanego barwnika zawiera 3 grupy karboksylowe, po jednej przy każdym pierścieniu aromarycznym oraz 1 grupę metoksyłową (w położeniu meta wobec grupy karboksylowej pojedynczego pierścienia) i 1 hydroksylową (w położeniu para wobec grupy karboksylowej trójcząłonowego pierścienia).

Dalsze badania wykonane przez Doktorantkę zmierzały do oceny zdolności lakazy grzybowej w utlenianiu bezbarwnych prekursorów do barwnych produktów. W tym celu przebadano 15 substratów organicznych, będących pochodnymi aminowymi, hydroksylowymi, metoksyłowymi i karboksylowymi benzenu i naftalenu. Testowanie wybranych substratów przeprowadzono z zastosowaniem oczyszczonej lakazy pochodzącej z *Cerrena unicolor*, powszechnie występującej huby pod nazwą gmatkówka szara. Taką drogą uzyskano aż 29 produktów o zróżnicowanych barwach od żółtych przez odcienie brązowe aż do niebieskich.

Stosunkowo wysoki potencjał oksydoredukcyjny, zastosowanej lakazy wynoszący 0,79 V, umożliwiał przebieg substytucji nukleofilnej, sprzęgania substratów zawierających pierścienie aromatyczne w postaci dimerów oraz utlenianie podstawników.

Uzyskane produkty barwne poddane były testom barwierskim, wyznaczeniu trwałości uzyskanych barwników na włóknach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego w warunkach naświetlania oraz zmienności pH. Wyłoniono wówczas dwa gatunki grzybów *Nematoloma frowardii* i *Pleurotus ostreatus* jako najbardziej przydatne do syntezy badanych barwników, poprzez tworzenie zewnątrzkomórkowej lakazy. Ostatecznie do optymalizacji syntezy barwników wybarno grzyb *Pleurotus ostreatus* ze względu na niską toksyczność hodowli, intensywną barwę oraz trwałość. Optymalizację środowiska reakcji, prowadzącej do wytworzenia barwnika rozpoczęto od modulowania pH, dobierając skład i stężenie stosowanych buforów. W wyniku badań ustalono, że przy 3mM stężeniu prekursora najbardziej odpowiedni jest 40mM bufor sodowo-winianowy o pH 5,5.

W dalszym etapie optymalizacji procesu tworzenia barwnych produktów zastosowano wytrąsane hodowle grzybowe z unieruchomioną biomasą na siatce polipropylenowej. Takie rozwiązanie pozwalało na osiągnięcie wyższej wydajności tworzenia barwnego produktu. W tych działaniach optymalny okazał się 10 mM bufor sodowo-winianowy o pH 4. Innym podejściem było testowanie nośnika makroporowatego B (pozbawionego grup funkcyjnych) oraz akrylowego C (z grupami C₁₈). Te poczynania nie doprowadziły jednakże do zadowalających wyników. Pozostano zatem przy stwierdzeniu, że najkorzystniejszym wariantem jest zastosowanie buforu sodowo-winianowego o pH 4,5, który zapewniał nawet większą aktywność lakazy oraz jej trwałość utrzymującą się przez 21 dni. Na koniec przeprowadzono ocenę toksyczności otrzymanego produktu barwnego (test Microtox) oraz jego działanie antymikrobiologiczne poprzez ocenę wzrostu mikroorganizmów jak również wyznaczenie właściwości antyoksydacyjnych. Wykazano umiarkowaną aktywność antyoksydacyjną oraz niską toksyczność używanego barwnika N15, co przesądza o perspektywach jego dalszego zastosowania.

Pracę zakończono analizą kosztów odczynników i kosztów operacyjnych, koniecznych do wytworzenia 1 g produktu barwnego N15. Z przedstawionych trzech wariantów prowadzonego procesu wersja z unieruchomioną biomasą i lakazą natywną pozostawały na podobnym poziomie (605 i 677zł/1g) natomiast wersja z unieruchomioną lakazą wymaga ponad dwukrotnie większych nakładów finansowych (1211zł/1g). Ze względu jednakże na fakt, że przeprowadzona kalkulacja kosztów pozyskania jednostkowej masy barwnika przeprowadzona była na podstawie

laboratoryjnych warunków syntezy, można oczekiwać iż przejście na większą skalę techniczną umożliwi pozyskanie produktu w sposób bardziej ekonomiczny, obniżając przede wszystkim koszty operacyjne wariantu z unieruchomioną biomasą.

Poza ogromnymi walorami pracy można dostrzec w pracy kilka nieścisłości do których pragnę się odnieść. Należą do nich:

na str. 12 pada stwierdzenie: *Ponadto enzymy te mogą utleniać związki niefenolowe, a także nieorganiczne, jak $Fe(CN)_6^{4-}$ czy $Mo(CN)_6^{4-}$* . Należy zaznaczyć, że zacytowane wzory odnoszą się nie do całych związków nieorganicznych lecz tylko do ich anionów, w których grupy cjankowe połączone są koordynacyjnie z żelazem II lub molibdenem II ,

na str. 97 i 98 padają określenia: **zmierzono** aktywność lakazy czy peroksydazy, zamiast **wyznaczono** aktywność enzymów jak występuje to przy opisie metodyki na str. 76 i 77

na str. 128 znajdujemy stwierdzenie, że stosowanie buforu o niższych stężeniach miało istotny wpływ na wydajność immobilizacji lakazy.. w tym przypadku do prawidłowego wnioskowania brakuje testu istotności,

na str. 133, rys. 44 stwierdzenie: *aktywność lakazy przechowywanej w buforze o pH 5,5 była najwyższa w porównaniu do pozostałych*, ale czy istotna statystycznie? Z półprzedziałów ufności wygląda, że słupki na siebie chyba zachodzą, (Podobna uwaga odnosi się do zamieszczonych wartości w Tab.19, str. 101 oraz Tab.26 str. 128),

na str. 142 stwierdzono: *wpływ wartości pH buforu sodowo-winianowego na wartość potencjału oksydoredukcyjnego substratu N15*. Należy podkreślić, że pomiędzy kolejnymi roztworami o pH 4, pH 4,5, pH 5, pH 5,5 teoretycznie powinna istnieć różnica Eh wynosząca ok.0,030 V (0,059 V na jedną jednostkę pH). Tzn. Kolejne bufony powinny posiadać np. wartości Eh 0,950: 0,920: 0,890 i 0,830 V. Wyznaczone natomiast przez Doktorantkę wartości Eh wynosiły 0,950: 0,929: 0,924, 0,919 V. Należałoby zatem to stwierdzenie zamieszczone w pracy odwrócić, wskazując na rolę 1mM barwnika N15 w buforowaniu stanu rekoks, stąd interesującym wydaje się równoczesny pomiar pH i Eh podczas tworzenia się związków barwnych z udziałem lakazy,

na str. 148 zamieszczono ogólne informacje o rozpuszczaniu liofilizatu barwnika N15, szkoda, że nie podano wartości rozpuszczalności w etanolu i roztworach zakwaszonych i alkalizowanych, jeżeli już wykonano te badania,

Doktorantka bardzo często stosuje przyimek **dla** np. dla stężenia, dla roztworu, dla buforu, dla wariantu, dla produktu it.d. Przyimek ten bywa znacząco nadużywany obecnie nie tylko w języku potocznym. Trzeba przyznać, że konstrukcja z **dla** upowszechniła się m.in. na skutek unikania celownika. W Słowniku Poprawnej Polszczyzny przypomina się, że tendencja do zastępowania form przypadków deklinacyjnych wyrażeniami przyimkowymi jest typowa w dziejach polszczyzny. Jednak byłoby dużo zgrabniej stosować go w zwrotach osobowych np. **dla** Pani, zostawiając formy deklinacyjne w innych przypadkach np. przy stężeniu, w roztworze, w wariancie i.t.d.

Należy stwierdzić również, że **Dyskusja** przyjmuje czasem postać streszczenia pracy stąd zdarzają się powtórzenia, jak w przypadku str.156, gdzie akapit o lakazie jest powtórzeniem ze str. 9 (rozdz.1.2.3).

Odnosząc się jednakże do całości uzyskanych przez Doktorantkę wyników, trzeba podkreślić przede wszystkim ich wysoką wartość merytoryczną. Praca stanowi bowiem całościowe studium nad występowaniem i funkcją lakazy grzybowej, jej specyficznością substratową i mechanizmem katalizy. Badania własne rozciągające się szeroko poprzez przygotowania podłoża hodowlanego, doboru składu mieszaniny reakcyjnej, optymalizację składu mieszaniny transformacyjnej, temperatury i odczynu doprowadziły do pozytywnego ustalenia parametrów technologicznych otrzymywania interesujących substancji barwnych o szerokiej gamie możliwości.

Ustalenie natomiast struktury, rozmiarów cząsteczki i właściwości antyoksydacyjnych oraz wyznaczenie parametrów technologicznych biosyntezy barwnika z udziałem lakazy, dopełnia wartość przeprowadzonych na dużą skalę badań. Należy również zauważyć ogromny wkład pracy Autorki zarówno w części badawczej jak i dokumentacyjnej niniejszej dysertacji. Łączę głęboką nadzieję, że wkład pracy i niezmiernie ciekawa tematyka zaowocują w dalszym prowadzeniu badań.

Oceniam pozytywnie recenzowaną rozprawę doktorską i proponuję dopuścić Panią

mgr Kamilę Wlizio do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zgłaszam ponadto wniosek o nagrodzenie przedstawionej do oceny pracy doktorskiej przez Radę Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS.