Prof. dr hab. Ewa Huszcza
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Chemii

Wrocław, 18.05.2018

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Kamili Wlizło
pt.: „Synteza substancji barwnych w procesie biokatalizy i ocena ich właściwości"

Zastępowanie barwników powstających w uciążliwych dla środowiska procesach syntezy organicznej, nietoksycznymi barwnikami wytwarzanymi w zwykle łagodnych procesach biotransformacji, to obiecujący kierunek badań o wyraźnym aspekcie aplikacyjnym. Jeden z wielu rozwijanych w zespole Pani Profesor Anny Jarosz-Wilkołazkiej, pod której kierunkiem wykonana została przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr. Kamili Wlizło. W badaniach z obszaru zielonej chemii, czy też – jak je lokuje sama Doktorantka – z zakresu białej biotechnologii, jako biokatalizatory zastosowano grzyby i izolowaną z nich lakazę, zaś substratami były naturalne i syntetyczne związki aromatyczne podstawione grupami hydroksylowymi, metoksylowymi, karboksylowymi, sulfonowymi i aminowymi.

Autorka wyznaczyła sobie sprecyzowane cele badawcze: selekcję substratów oraz organizmu grzybowego stanowiącego źródło lakazy do otrzymywania barwnych związków, opracowanie warunków biotransformacji, prowadzących do efektywnego otrzymywania wybranego barwnika, i ocenę właściwości otrzymanego produktu.

Dysertacja Pani mgr Kamili Wlizło jest napisana bardzo ładnym językiem, precyzyjnym i poprawnym stylistycznie. Jest to kompletny dokument opisujący zaplanowane, zrealizowane i udokumentowane eksperymenty naukowe, a szczegółowy podział na podrozdziały pozwala czytelnikowi swobodnie poruszać się w tekście. Pomijając 4 nieczytelne rysunki (1, 2, 14, 18) i jedną tabelę (15), redakcja pracy jest staranna, bardzo dobre wrażenie robi jej strona estetyczna. Za trafiony pomysł uważam zamieszczanie krótkiego, zwięzłego posumowania w zakończeniu opisu każdego etapu badań.

Dysertacja doktorska została zredagowana w układzie klasycznym, składa się z ośmiu zasadniczych części: wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia oraz spisu cytowanej literatury. Jest to obszerne, 200 stronicowe opracowanie

uzupełnione bibliografią, obejmującą niemal 200 pozycji literaturowych. Otwiera ją interesujący i obszerny przegląd literaturowy, wprowadzający czytelnika w problematykę prowadzonych badań, który uzasadnia celowość podjętych wysiłków naukowych. Autorka omówiła w nim występowanie, funkcje i budowę lakaz, mechanizm reakcji katalizowanych przez te enzymy, sposoby otrzymywania barwników z użyciem lakaz oraz perspektywy zastosowań przemysłowych.

Wyniki i dyskusja są mocną stroną pracy doktorskiej. Pani mgr Kamila Wlizło przeprowadziła badania selekcyjne substratów służących do otrzymywania związków barwnych, wykorzystując jako biokatalizator lakazę pozyskaną z modelowego organizmu grupy badawczej Pani Profesor Anny Jarosz-Wilkołazkiej – grzybów *Cerrena unicolor*. Powstałe w wyniku homo- i heteromolekularnych transformacji produkty, w liczbie 29, Doktorantka oceniła pod kątem właściwości barwierskich, odporności na działanie wysokiej temperatury, światła słonecznego i zmiany pH. Do dalszych badań wybrała 6 barwników. W kolejnym etapie zbadała zdolność 11 szczepów grzybowych znanych z wytwarzania lakazy do syntezy wspomnianych wcześniej 6 związków barwnych z odpowiednich prekursorów. Kryterium selekcji w hodowlach płytkowych był szeroki zasięg barwnika przy jednocześnie niewielkim zasięgu grzybni. Tym sposobem zostały wyłonione cztery grzyby: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Nematoloma frowardii* i *Rhizoctonia praticola* oraz substraty do syntezy trzech barwników: N15, N16 i N15+18.

Kolejne badania selekcyjne zmierzały do wytypowania pary drobnoustrój – barwnik, która w trzech cyklach biotransformacji prowadzonej przez unieruchomioną na siatce polipropylenowej biomasę, pozwalała na uzyskanie największej ilości barwnika, przy najmniejszym przyroście biomasy i w najkrótszym czasie. Przy wyborze biokatalizatora Doktorantka kierowała się dodatkowo aktywnością zewnątrzkomórkowej lakazy wytwarzanej w hodowlach prowadzonych na 4 różnych pożywkach. Ostatecznie głównym obiektem badań stały się grzyby *Pleurotus ostreatus* i barwnik powstający przy użyciu substratu N15 (kwasu 2-amino-3-metoksybenzoesowego).

Badania optymalizacyjne procesu syntezy barwnika N15 zostały przeprowadzone w trzech układach transformacyjnych: z użyciem natywnej lakazy wyizolowanej z hodowli grzybów *Pleurotus ostreatus*, unieruchomionej biomasy grzyba oraz lakazy immobilizowanej.

Działania te obejmowały m. in.: dobór odpowiedniego medium reakcji, czyli pożywki lub buforu, jego stężenia, a także stężenia substratu i enzymu oraz temperatury reakcji biotransformacji. W trzecim z wymienionych układów transformacyjnych dobrany został

również odpowiedni nośnik enzymu. Należy podkreślić, że Pani mgr Kamila Wlizło wykonała imponującą ilość eksperymentów optymalizacyjnych, na podstawie których można wysunąć przypuszczenie, że proces syntezy barwnika N15 da się przenieść do większej skali. Szacowany koszt otrzymywania produktu oraz czas trwania całego procesu przemawiają za wariantem z unieruchomioną biomasą grzybów *Pleurotus ostreatus*, przy czym sama Autorka zwraca uwagę na fakt, że podane koszty dotyczą jednorazowego wykorzystania biokatalizatora, co w przypadku unieruchomionej biomasy i enzymu, które – jak wykazano – mogą być wykorzystane wielokrotnie, jest dla tych rozwiązań kryterium niekorzystnym.

Otrzymany pomarańczowy barwnik N15 okazał się mieszaniną co najmniej czterech związków, przy czym Doktorantka wykazała, że produkt główny powstaje w procesie nieenzymatycznym, przypuszczalnie w wyniku sprzęgania produktów biotransformacji. Produkt ten ma charakter hydrofilowy, rozpuszcza się dobrze w wodzie i metanolu, nie rozpuszcza w octanie etylu, acetonie i chloroformie. Nie wykazuje aktywności antymikrobiologicznej wobec patogenicznych bakterii *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* oraz drożdży *Candida albicans*. Nie wykazuje aktywności cytotoksycznej wobec ludzkich prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego. Cechuje go umiarkowana zdolność do zmiatania wolnych rodników. Z badań wykonanych w laboratorium analiz włókienniczych TKANLAB w Łodzi wynika, że otrzymany barwnik N15, oprócz dobrych właściwości barwierskich, charakteryzuje się wysokim stopniem odporności na wiele czynników występujących podczas użytkowania, przez co można określić go mianem użytecznego.

W mojej opinii swoistym zwieńczeniem opisanych w dysertacji badań byłoby określenie budowy chemicznej wszystkich produktów biotransformacji, co najprawdopodobniej pozwoliłoby na przedstawienie mechanizmu reakcji zarówno katalizowanych enzymatycznie, jak i chemicznie. Doktorantka zaproponowała wprawdzie strukturę głównego produktu syntezy, jednak nie poparła jej żadnym dowodem. Wynik analizy LC-MS jest jedynie jedną ze składowych danych służących do rozwiązania problemu, przy czym uznane czasopisma naukowe w przypadku związków nowych wymagają masy molekularnej wyznaczonej w analizie HR-MS, czyli z dokładnością do jednej dziesięciotysięcznej. Pomocne byłyby z pewnością analizy widm IR związków, konieczne zaś analizy widm NMR. Ze wspomnianych wyżej względów uważam, że wnioski 3 i częściowo 4 są formalnie założeniami pracy doktorskiej.

W pracy zauważyłam kilka błędów w nazewnictwie:

- Ryc. 6, związek 1 posiada trzy grupy hydroksylowe, nie dwie,

- Ryc. 13, heterocyklicznego ośmioczłonowego pierścienia nie można określać terminem cyklookten,
- str. 32, Osama i wsp. porównywali koszty otrzymania lakazy w hodowli prowadzonej na podłożu stałym (SSF- solid state fermentation) i wgłębnej/płynnej (SmF), a nie w hodowli stacjonarnej i wgłębnej; poza tym terminy te dotyczą nieporównywalnych kategorii systemów hodowlanych,
- str. 63, substraty zawierały grupy aminowe, a nie nitrowe
- str. 78, ABTS – prawidłowa nazwa to sól diamonowa kwasu 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiozolino-6-sulfonowego)

i innych drobnych uchybień:

- str. 55, wyautoklawować pożywkę, niezręczne sformułowanie,
- nietypowo zatytułowany rozdział – „wyniki przedstawianej pracy są przedmiotem",
- tabela 4 – zaproponowane akronimy nie były później stosowane,
- na Ryc. 20 nie znalazłam wyników dla układu N7+14 wymienionego na str. 79,

które nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę przedstawionej rozprawy.

Powyższe uwagi nie obniżają wartości naukowej przedłożonej do recenzji pracy. Uzyskane w części eksperymentalnej wyniki są oryginalne, wartościowe i posiadają duży potencjał aplikacyjny. Praca jest dobrze zredagowana i uzupełniona bogatą częścią literaturową. Autorka włożyła w jej przygotowanie wiele wysiłku, posiadła umiejętność formułowania i rozwiązywania problemów badawczych oraz wyciągania wniosków. Rozprawa oraz dorobek naukowy wskazują na dojrzałość naukową Doktorantki.

Na tej podstawie stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wszystkie warunki jakie stawia się dysertacjom doktorskim (Artykuł 13 „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki", Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami) i dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr. Kamili Wlizło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę zakres wykonanych przez Doktorantkę badań oraz ich wartość naukową wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.

Ewa Huwe