



Opole, 26.11.2019

Dr hab. Małgorzata Pawełczak, prof. uczelni
Zakład Chemii Fizycznej i Modelowania Molekularnego
Wydział Chemii
Uniwersytet Opolski w Opolu

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR BEATY SZMIGIEL-MERENY

pt. „ZASTOSOWANIE BIOTRANSFORMACJI DO SYNTEZY ANTYOKSYDANTÓW”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Żymańczyk-Dudy, prof. uczelni i dr inż. Małgorzaty Brzezińskiej-Rodak. Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest aktualna i dotyczy wykorzystania grzybów pleśniowych do syntezy fenoli o aktywności antyoksydacyjnej.

INFORMACJE OGÓLNE

Dysertacja doktorska mgr Beaty Szmigiel-Meremy liczy łącznie 163 strony tekstu, w tym 56 rysunków oraz 9 tabel. Pod względem edytorskim przygotowana została starannie. Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych. Po stronie tytułowej, podziękowaniach i spisie treści, znajduje się DOROBEK NAUKOWY Doktorantki. Następnie pięciostronicowe STRESZCZENIE i 6 zasadniczych rozdziałów: WSTĘP, CEL PRACY, MATERIAŁY, METODY, BADANIA WŁASNE, PODSUMOWANIE, na końcu znajduje się WYKAZ OPRACOWANYCH METOD SYNTEZY PRODUKTÓW BIOTRANSFORMACJI 2-FENYLOETANOLU i BIBLIOGRAFIA. Rozdziały: WSTĘP, MATERIAŁY, METODY i BADANIA WŁASNE mają rozbudowaną strukturę podrozdziałów. Praca napisana jest zrozumiałym językiem, chociaż mam lekkie zastrzeżenia, co do prawidłowej konstrukcji zdań w języku polskim. Czasami odnoszę wrażenie, że szyk wyrazów w zdaniu jest bardziej zgodny z gramatyką angielską niż z polską. W pracy znajduje się również niewielka ilość zwrotów żargonowych i zapożyczonych z języków obcych. Trochę niezręcznie Autorka opisała metodykę wyznaczania krzywych wzrostu mikroorganizmów: „W celu wyznaczenia krzywych wzrostu grzybów przygotowano szereg kolb stożkowych (250 mL), zawierających po 100 mL sterylnej podłoża ziemniaczanego



(PDB), zaszczerpionego odpowiednią dla danego organizmu, objętością inokulum.” Wskazane raczej jest zastosowanie sformułowania: przygotowano zawiesiny grzybów w podłożu PDB Kolby stożkowe to tylko naczynia, w których znajdują się te zawiesiny. Tabele i rysunki zostały przygotowane bardzo starannie.

Przytoczona bibliografia została prawidłowo dobrana do tematyki rozprawy i obejmuje 233 pozycje. W większości cytowane są prace z ostatnich 10 lat, co świadczy o aktualności podjętej przez Doktorantkę tematyki.

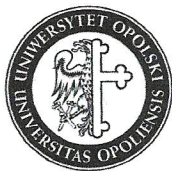
Na działalność naukową Doktorantki składają się: 7 publikacji naukowych, w tym dwie wysłane do redakcji czasopism, 6 komunikatów na konferencjach i 3 zgłoszenia patentowe.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

WSTĘP (60 stron) stanowi wprowadzenie do tematyki badań opisanych w dysertacji i składa się z 4 podrozdziałów, z których każdy jest dodatkowo rozbudowany. W rozdziale tym znajduje się 37 rysunków. W pierwszym podrozdziale (na prawie 12 stronach) Doktorantka dokonała przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat wolnych rodników, ich źródeł i wpływu na organizm. W kolejnym podrozdziale omówiła antyoksydanty, naturalne mechanizmy obronne organizmu oraz właściwości i zastosowanie roślinnych antyoksydantów. W podrozdziale trzecim zostały omówione biokatalizatory stosowane w biotransformacjach. W ostatnim z podrozdziałów autorka scharakteryzowała produkty biotransformacji 2-fenyletanolu, ich właściwości i otrzymywanie. Opracowanie wstępu dysertacji wskazuje, że Autorka wykazała się znajomością podstaw teoretycznych, które były przedmiotem zrealizowanych prac eksperymentalnych.

Po WSTĘPIE teoretycznym Doktorantka sformułowała CEL PRACY, którym było „wykorzystanie grzybów pleśniowych do syntezy niskocząsteczkowych polifenoli o aktywności antyoksydacyjnej – drogą biokonwersji niedrogiego materiału wyjściowego 2-fenyletanolu.” W tym rozdziale Doktorantka nadmieniła, że istotnym celem badań była optymalizacja procesu biokatalizy oraz powiększenie skali procesu.

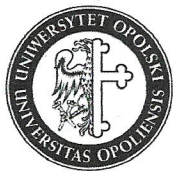
W rozdziale MATERIAŁY na trzech stronach Autorka przedstawiła spis odczynników chemicznych stosowanych przy realizacji pracy, składniki podłoża hodowlanych oraz mikroorganizmy wykorzystywane w badaniach. Na ostatniej stronie znajduje się wykaz aparatury stosowanej przy realizacji pracy. W następnym rozdziale METODY opisana została metodyka przygotowania biokatalizatorów, procedury prowadzenia biotransformacji, metody



analizy stosowane w pracy do rozdzielenia produktów biotransformacji i potwierdzenia struktur produktów. Na podstawie krzywych wzrostu poszczególnych grzybów Doktorantka ustaliła optymalny czas ich hodowli, aby stosowane biokatalizatory były najbardziej aktywne. W celu rozdzielania produktów biotransformacji i potwierdzenia wyników badań korzystała z wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i średniociśnieniowej chromatografii cieczowej (FPLC). Struktury otrzymanych produktów Doktorantka potwierdziła za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego oraz spektrometrii mas. Konfigurację absolutną produktu biotransformacji ((S)-1-fenylloetan-1,2-diolu) potwierdziła stosując metodę chromatografii gazowej z kolumną Chirasil-DEX CB, natomiast liczbę zarodników grzybów *A. niger* zmierzyła za pomocą cytometru przepływowego. Metodyka stosowana w pracy nie budzi zastrzeżeń.

W kolejnym rozdziale pracy, zatytułowanym BADANIA WŁASNE, Doktorantka na 38 stronach opisała przeprowadzone przez siebie badania i dokonała interpretacji wyników w oparciu o literaturę przedmiotu. Rozdział ten składa się z pięciu podrozdziałów, z których cztery zostały jeszcze dodatkowo podzielone. W rozdziale tym znajduje się w 14 rysunków oraz 5 tabel. Omawianie wyników Autorka rozpoczęła od uzasadnienia, dlaczego jako substrat do syntezy polifenoli został zastosowany 2-fenylloetanol. Każdy etap postępowania Doktorantka uzasadniała cytując odpowiednią literaturę przedmiotu. Do badań Autorka zastosowała cztery gatunki grzybów: *Aspergillus niger* (KKP 2301), *Rhizopus oryzae* (DSM 1185), *Beauveria bassiana* (DSM 875) oraz *Beauveria brongniartii* (DSM 6651). Dla każdego z nich wyznaczyła krzywe wzrostu i ustaliła optymalny czas hodowli w celu uzyskania jak najwyższej aktywności biokatalizatorów. W celu opracowania najefektywniejszej metody biokonwersji 2-fenylloetanolu Doktorantka prowadziła badania przy różnych stężeniach substratu, z zastosowaniem różnych postaci biokatalizatorów i różnych czasów trwania biotransformacji. Przedstawione w dysertacji wyniki wskazują na zdolność szczepu grzybów *Aspergillus niger* (KKP 2301) do modyfikacji 2-fenylloetanolu do kwasu 4-hydroksyfenyllooctowego i hydroksytyrozolu oraz optycznie czystego (S)-1-fenylloetan-1,2-diolu. Do modyfikacji 2-fenylloetanolu Doktorantka korzystała również z grzybów *Rhizopus oryzae* (DSM 1185) i *Beauveria bassiana* (DSM 875).

Wydańności opracowanych metod syntezy produktów biotransformacji 2-fenylloetanolu były różne w zależności od zastosowanego biokatalizatora i formy w jakiej został on zastosowany. Odpowiedni dobór warunków konwersji biologicznej pozwolił na podniesienie



wydajności procesu. Modyfikacja pożywki hodowlanej dodatkiem substratu prowadziła do otrzymania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego z wydajnością 18% (biokatalizator – *Aspergillus niger*). Biotransformacja 2-fenyloetanolu w bioreaktorze okresowym w opisanych w dysertacji warunkach z zastosowaniem wolnych komórek *Aspergillus niger* prowadziła do otrzymania jednego produktu - (*S*)-1-fenyloetan-1,2-diolu z wydajnością 65%. Opracowana metoda syntezy tego związku została objęta zgłoszeniem patentowym.

Jeden z zastosowanych biokatalizatorów *Beauveria brongniartii* (DSM 6651) nie był skuteczny w biokonwersji 2-fenyloetanolu, jednak degradował substrat. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów zwrócono uwagę, że 2-fenyloetanol inkubowany z komórkami *Beauveria brongniartii* ulegał postępującej biodegradacji. Po jednym dniu procesu związek został całkowicie rozłożony. Na podstawie prezentowanych wyników Doktorantka uważa, że *Beauveria brongniartii* może mieć zastosowanie do degradacji odpadów chemicznych i kosmetycznych, czyli może być punktem wyjścia do opracowania metody bioremediacji w środowisku skażonym niskocząsteczkowymi polifenolami.

W rozdziale PODSUMOWANIE Doktorantka przedstawiła omówione wcześniej wyniki badań w punktach. Dla każdego z przeprowadzonych procesów Doktorantka podała parametry biotransformacji (biokatalizator, stężenie substratu i czas) oraz wydajność. Na uwagę zasługuje umieszczona na końcu pracy tabela z wykazem opracowanych metod syntezy produktów biotransformacji 2-fenyloetanolu, w której w przejrzysty sposób zostały zaprezentowane wyniki.

W trakcie czytania dysertacji nasunęły mi się pewne pytania i proszę Autorkę pracy o ich wyjaśnienie:

1. Ilościowo stężenie produktów biotransformacji wyznaczano na podstawie krzywych kalibracyjnych. Wprawdzie Doktorantka opisuje, w jaki sposób to zrobiła, ale chciałabym, żeby w czasie obrony publicznej przedstawiła przykładowe krzywe kalibracyjne i równania na podstawie, których wyznaczała stężenie produktów.
2. W dysertacji podano, że eksperymenty prowadzone były w trzech powtórzeniach i na wykresach podane są prawdopodobnie wartości odchylenia standardowego, ale nie znalazłam komentarza w tekście. Proszę o komentarz.



3. Proszę uściślić, jaką gęstość zarodników testowanych grzybów stosowano w procesach biotransformacji, bo w rozdziale 3.6 podano tylko liczbę zarodników *Aspergillus niger* (KKP 2301).

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że dysertacja stanowi istotny wkład w opracowanie metod syntezy niskocząsteczkowych polifenoli o właściwościach antyoksydacyjnych. **W trakcie realizacji zaplanowanych badań Doktorantka osiągnęła stawiane sobie cele.** Część przedstawionych wyników badawczych była podstawą publikacji w czasopismach naukowych i została już oceniona przez niezależnych recenzentów oraz była podstawą trzech zgłoszeń patentowych, a część z nich zapewne zostanie wkrótce opublikowana.

Reasumując, stwierdzam, że praca doktorska pt. „ZASTOSOWANIE BIOTRANSFORMACJI DO SYNTEZY ANTYOKSYDANTÓW” **spełnia ustawowe wymagania** określone w art.13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca z 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65, poz.595, z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr Beaty Szmigiel-Meremy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stefania Reversal