



Poznań, 10.02.2015

dr hab. Arkadiusz Ptak  
Instytut Fizyki  
Politechnika Poznańska  
e-mail: arkadiusz.ptak@put.poznan.pl  
tel. +48 61 665 3233

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ  
mgr. inż. Krzysztofa Kolmana  
pt. „Adsorpcja białek na smektycznych glinokrzemianach”

Niniejsza recenzja sporządzona została na prośbę Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Promotorem rozprawy doktorskiej jest prof. dr hab. inż. Jacek Pięgowski, Kierownik Zakładu Inżynierii i Technologii Polimerów Wydziału Chemicznego PWr, natomiast promotorem pomocniczym – dr inż. Adam Kiersnowski.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Krzysztofa Kolmana poświęcona jest zagadnieniom adsorpcji białek, w szczególności białka jaja kurzego, na naturalnych i syntetycznych glinokrzemianach z grupy smektytów. Jest to tematyka istotna nie tylko z poznawczego punktu widzenia, ale również aplikacyjnego. Układy białko/smektyt zastosowano lub planuje się zastosować jako biokompozyty, koloidalne układy transportowe, biosensory czy układy konstrukcyjne w inżynierii tkankowej. Szczególnie ważne jest naturalne pochodzenie obu składników, tj. białka i smektytu, które w dużej mierze determinuje takie właściwości jak nietoksyczność, biogodność i biodegradowalność, czyli cechy istotne z punktu widzenia medycyny i ekologii. W badaniach wykorzystane zostały następujące techniki badawcze: elektroforeza, dyfraktometria rentgenowska, dynamiczne rozpraszanie światła, technika mikrowagi kwarcowej, spektroskopia i mikroskopia sił atomowych, mikroskopia elektronowa oraz modelowanie i symulacje komputerowe.

Bezpośrednim celem badań było określenie natury oddziaływań smektyt-białko oraz opisanie zmian struktury smektytu pod wpływem adsorpcji białek, jak również towarzyszących temu procesowi zmian struktury białek. Badane były zarówno mieszaniny białek, jak i białka izolowane: owalbumina, lizozym, owotransferyna oraz owomukoid.

Temat rozprawy jest jasno sformułowany, prawidłowo wskazuje zawartość rozprawy. Można byłoby jedynie dodać informację precyzującą rodzaj badanych białek.

Struktura rozprawy jest klasyczna z podziałem na pięć typowych rozdziałów zawierających: cele pracy, przegląd literatury, część eksperymentalną, dyskusję rezultatów badań oraz podsumowanie i wnioski. Rozprawa liczy 107 stron łącznie z wykazami skrótów i symboli, obszerną bibliografią



(zawierającą 190 pozycji), spisami rysunków i tabel oraz wykazem dorobku naukowego Doktoranta. Poprzedzona jest streszczeniami w języku polskim i angielskim.

Po wprowadzeniu i zdefiniowaniu celu pracy, kolejny rozdział Autor poświęca opisowi badanych materiałów: smektytom, białkom oraz ich wspólnym układom, bogato zaopatrując go w odnośniki literaturowe (zgodnie z nazwą rozdziału „Przegląd literaturowy”). Dużą zaletą rozdziału jest zwięzłe i przystępne wprowadzenie czytelnika, bez konieczności korzystania z zewnętrznych źródeł, do podstawowych zagadnień dotyczących badanego w pracy materiału. Wśród informacji dotyczących modyfikowania smektytów znajduje się stwierdzenie o możliwości zastępowania związków amfifilowych związkami wielkocząsteczkowymi jak polimery czy białka. W związku z tym pojawia się pytanie: czy rzeczywiście wprowadzanie dużo większych cząsteczek w miejsce mniejszych jest prostym chemicznym zastępowaniem, czy rodzi jednak większe implikacje, wywołując np. niepożądane zmiany strukturalne?

Rozdział trzeci – stosownie do nazwy „Część eksperymentalna” – zawiera opis przygotowania próbek oraz użytej w badaniach aparatury pomiarowej, a także symulacji komputerowych. Zarówno opisy preparatyki jak i technik badawczych są kompletne, z dużą dbałością o szczegóły, zawierają liczne odsyłacze literaturowe. Jedynie w opisie przygotowania dyspersji smektytów i roztworów białek nie ma odsyłaczy literaturowych, co może sugerować zastosowanie przez Doktoranta własnych procedur.

Wielość i różnorodność użytych technik pomiarowych, z których każda dostarcza cennych i wzajemnie komplementarnych informacji, jest niewątpliwą zaletą rozprawy i świadczy o wszechstronnym przygotowaniu Doktoranta. Pomimo braku jasnej deklaracji, że wszystkie pomiary zostały wykonane osobiście przez Doktoranta, zakładam że zdecydowana większość z nich, a w szczególności pomiary wykonane w Instytucie Maxa Plancka Badań Polimerów w Mainz, które stanowią trzon rozprawy, zostały wykonane osobiście bądź z dominującym udziałem Doktoranta. W ostatnim punkcie rozdziału trzeciego opisana jest metoda modelowania i symulacji układu smektyt/białko. Autor wykorzystał jeden z modeli uproszczonych tzw. model gruboziarnisty. Model taki pozwala skrócić czas obliczeń w porównaniu z zastosowaniem alternatywnych modeli atomowych. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że podstawowa idea obu rodzajów modeli, czyli tzw. pole siłowe (zespoł prostych funkcji analitycznych opisujących oddziaływania międzyatomowe i międzymolekularne), wywodzi się z zasad fizyki klasycznej, czas obliczeń powinien skalować się w przybliżeniu liniowo z liczbą elementów modelowanego układu. Czy zatem nie byłoby warto wydłużyć kilkakrotnie czas obliczeń, aby uzyskać precyzyjniejsze wyniki z zastosowaniem modelu atomowego?

Rozdział czwarty – najobszerniejszy z rozdziałów – to dyskusja rezultatów badań. Podzielony jest na cztery podrozdziały z czego trzy pierwsze dotyczą wyników eksperymentalnych adsorpcji białek na smektytach, natomiast ostatni symulacji komputerowych. W podrozdziale 4.1 Autor opisał wyniki



badan adsorpcji białek jaja kurzego na stałym podłożu naturalnego smektytu. W końcowym efekcie adsorpcja białek prowadzi do delaminacji struktury warstwowej i rozpadu ziaren smektytu. Jednak najbardziej zaskakującym wynikiem jest kolejność i efektywność adsorpcji poszczególnych białek ustalona na podstawie elektroforegramów. Otóż okazuje się, że najszybciej adsorbują owalbumina i owotransferyna, czyli białka nie preferowane elektrostatycznie w warunkach przeprowadzonych eksperymentów. Szczególnie zaskakująca jest silna adsorpcja owalbuminy, która przy pH większym niż jej punkt izoelektryczny równy 4,5 charakteryzuje się dużym wypadkowym ładunkiem ujemnym podobnie jak powierzchnia smektytu. Częściowego wyjaśnienia tego efektu dostarczają wyniki modelowania i symulacji komputerowych opisane w podrozdziale 4.4. Niejasnym natomiast wydaje się wyjaśnienie poprzez synergizm i tworzenie kompleksów zupełnie różnej adsorpcji lizozymu i owomukoidu (s. 47). Podczas gdy adsorpcja lizozymu prawie nie ulega zmianie w całym procesie adsorpcji mieszaniny białek, obserwowana jest wzmożona adsorpcja owomukoidu w drugim etapie procesu. Tak różne zachowanie adsorpcyjne obu białek wydaje się przeczyć zaproponowanemu wyjaśnieniu. Zupełnie inaczej jest w przypadku dużej i zbliżonej adsorpcji owalbuminy i owotransferyny w początkowym okresie procesu adsorpcji białek. W tym przypadku, wyjaśnienie poprzez synergizm i możliwe tworzenie kompleksów jest jak najbardziej uzasadnione.

W rozdziale 4.2 opisane zostały wyniki pomiarów dynamicznego rozpraszania światła dla cząstek smektytu zdyspergowanych w zawiesinie wodnej z dodatkiem mieszaniny białek jaja kurzego. Ostatecznie, z równania Stokesa-Einsteina, obliczane były wartości promienia hydrodynamicznego cząstek smektytu dla różnych stosunków masowych białek do smektytu: od 1 do 100 g/g. W zakresie od 1 do 20 g/g obserwowany jest spadek wartości promienia hydrodynamicznego, najprawdopodobniej na skutek rozpadu ziaren smektytu, jak sugeruje Autor. Myślę, że warto byłoby rozważyć również inne powody, a przede wszystkim zmianę samego otoczenia hydratacyjnego spowodowaną przyrastającą ilością zaadsorbowanego białka, które ekranuje powierzchniowy ładunek elektryczny na ziarnach smektytu. Natomiast dla stosunków masowych powyżej 50 g/g występuje nieznaczny wzrost wielkości promieni hydrodynamicznych ziaren, co – według Autora – związane jest z ich reaglomeracją lub pęcznieniem. W związku z tym, że wzrost ten jest niewielki – wynosi zaledwie kilka procent – należałoby dokonać szczegółowej analizy niepewności pomiarowych, by móc wyciągnąć wiarygodne wnioski. Niestety Doktorant nie przedstawił w pracy niepewności pomiarowych promienia hydrodynamicznego, pomimo że zamieścił wartości odchylenia standardowego dla wielkości pośrednich, które umożliwiały takie obliczenia. Niemniej główny obserwowany efekt zmniejszania wartości promienia hydrodynamicznego cząstek smektytu ze wzrostem stosunku masowego białek do smektytu wydaje się być bardzo istotnym spostrzeżeniem, szczególnie w kontekście zastosowań smektytów jako układy transportowe.

W kolejnym podrozdziale Autor analizuje wyniki pomiarów uzyskane dwiema metodami: mikroskopii sił atomowych (AFM) oraz mikrowagi kwarcowej (QCM). Dostarczają one informacji o adsorpcji białek na immobilizowanych cząstkach smektytu. W tym przypadku smektyt naturalny



został zastąpiony syntetycznym, który charakteryzuje się większymi i bardziej regularnymi płytkami. Częstki smektytu immobilizowane były poprzez silną adsorpcję do dodatnio naładowanych warstw tioli bądź silanów osadzonych odpowiednio na podłożu złotym lub krzemowym. Oszacowane z pomiarów SEM i AFM średnie pokrycie powierzchni wyniosło 65%. Jednym z przeprowadzonych eksperymentów było zdzieranie zaadsorbowanych obiektów z podłoża za pomocą ostrza AFM w kontaktowej technice pracy. Przy wartości siły nacisku ok. 20 nN zdejmowana była jedynie warstwa białek, bez widocznego wpływu na spodnią warstwę zaadsorbowanych smektytów. Ciekawym rozszerzeniem tego eksperymentu byłaby próba zdzierania warstwy smektytu przy użyciu znacznie sztywniejszych mikrobeleek. W ten sposób można byłoby określić progową wartość siły nacisku, przy której obserwuje się usuwanie smektytów z warstwy tioli czy silanów.

Na rysunku 4.13 przedstawione zostały tzw. krzywe siła-odległość zarejestrowane dla kontaktu z powierzchnią płytek smektytu przed i po adsorpcji białek. Ogólne spostrzeżenie jest następujące: siła adhezji pomiędzy ostrzem AFM a płytkami smektytu maleje po adsorpcji białek. Natomiast wyniki szczegółowe dla poszczególnych białek znów wydają się sprzeczne z intuicją, gdyż bez względu na znak wypadkowego ładunku elektrycznego białek (owalbumina lub lizozym) zmierzona siła adhezji jest większa niż dla białka elektrycznie obojętnego (owotransferyna). Interpretację utrudnia fakt, że przedstawione zostały krzywe uśrednione, które mogą zafałszowywać rzeczywistą sytuację w przypadku istnienia dwóch lub więcej typów krzywych, np. dla kontaktów z płytkami smektytu pokrytymi białkami, nie pokrytymi białkami oraz kontaktów z warstwami tioli lub silanów nie pokrytymi smektytem (35% powierzchni). Przydatne byłyby krzywe referencyjne dla ostatniego z wymienionych przypadków.

W ostatnim podrozdziale Dyskusji rezultatów badań przedstawione zostały wyniki symulacji komputerowych adsorpcji białek na smektytach. Dla wszystkich modeli białek, tj. owalbuminy, lizozymu oraz owotransferyny, stwierdzono oddziaływania nie tylko z powierzchnią, ale również krawędziami cząstek smektytu. W większości przypadków oddziaływania miały charakter elektrostatyczny, jedynie dla lizozymu można było zauważyć istotne oddziaływania van der Waalsa. Doktorant słusznie zauważył, że pomimo ładunku sumarycznego owalbuminy zgodnego co do znaku z ładunkiem powierzchniowym cząstek smektytu, adsorpcja była możliwa ze względu na nierównomierny rozkład ładunku w cząsteczce białka i istnieniu fragmentów łańcucha białkowego obdarzonego ładunkiem dodatnim silnie przyciąganym do powierzchni smektytu. Można do tego dodać przyciąganie van der Waalsa dla znacznych obszarów cząsteczki białka obojętnych elektrycznie.

Ostatni rozdział rozprawy zawiera podsumowanie i najważniejsze wnioski z wcześniejszej dyskusji rezultatów badań. Należy podkreślić, że wszystkie wyciągnięte przez Doktoranta wnioski mają uzasadnienie w prezentowanych wynikach.



Pod względem językowym i technicznym rozprawa została zredagowana bardzo starannie. Tekst czyta się bardzo dobrze, a występujące usterki redaktorskie czy literówki są nieliczne. Do usterek czysto technicznych zaliczyłbym użycie we wzorach 3.3 i 3.4 symbolu  $p_q$  zamiast  $\rho_q$  oznaczającego gęstość kwarcu albo umieszczenie w podpisie rysunku 4.5 litery C oznaczającej nieistniejący wykres. Zdarzyło się też kilka niezgrabnych bądź nieprecyzyjnych sformułowań, których przykłady z obowiązku recenzenta i braku poważniejszych zarzutów pozwolę sobie wymienić:

- „ładunek (najczęściej o ujemnym ładunku)” (s. 21),
- „pomiar wykonano na aparacie” (s. 40) – lepiej: za pomocą aparatu,
- „siły oddziaływań między atomami, jak również energie potencjalne definiowane są przez pola siłowe” (s. 41). Ściśle: siły oddziaływań są gradientem energii potencjalnych i dlatego nie są to wielkości niezależne.

Powyższe nieściśności nie umniejszają jednak w żaden sposób wartości rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko.

Podsumowując, Doktorant precyzyjnie sformułował cel badawczy, który potrafił z sukcesem zrealizować. Poprawnie dobrał i zastosował metody eksperymentalne, w tym symulacje komputerowe, uzyskując niezwykle obszerny zestaw wyników pomiarowych. Następnie je zinterpretował i poddał starannej analizie uzyskując ilościowe informacje charakteryzujące oddziaływanie białek z cząstkami smektytu. Ostatecznie, na podstawie wyników końcowych, poprawnie sformułował wnioski. Zarówno we wprowadzeniu teoretycznym, jak i w części eksperymentalnej oraz dyskusji wyników Doktorant odnosił się do szeroko i trafnie wybranych źródeł literaturowych.

Biorąc pod uwagę powyższą ocenę stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim przez „Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym” i wnoszę o dopuszczenie mgr. inż. Krzysztofa Kolmana do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Ponadto, uwzględniając nowatorskie i kompleksowe podejście do rozwiązania postawionego problemu naukowego, solidny warsztat badawczy, który zaprezentował Doktorant w swojej rozprawie, a także wagę uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy Pana mgr. inż. Krzysztofa Kolmana przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.