

Dr hab inż. Danuta Gillner
Politechnika Śląska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej
i Biotechnologii
ul. Krzywoustego 8
44-100 Gliwice
e-mail: Danuta.Gillner@polsl.pl

Gliwice, 14.09.2015 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Moniki Górak
pt. „Wykorzystanie sinic do otrzymywania chiralnych związków fosfonowych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Żymańczyk – Dudy, prof. Politechniki Wrocławskiej, dotyczy badań możliwości zastosowania cyjanobakterii jako biokatalizatorów w procesie otrzymywania chiralnych β -hydroksyfosfonianów na drodze selektywnej redukcji odpowiednich ketofosfonianów.

Cyanobakterie, jako jedna z największych populacji bakterii, stały się obiektem zainteresowania licznych grup badawczych z wielu dziedzin. Są one nie tylko źródłem wielu związków biologicznie aktywnych, znajdując zastosowanie m.in. jako suplementy diety, dodatki do pasz, nawozy, ale stanowią także interesujący surowiec do produkcji biopaliw czy w procesach bioremediacji. Jednym z najciekawszych zastosowań jest użycie cyjanobakterii jako biokatalizatorów w licznych badaniach procesów biotransformacji. Procesy te, jak wszystkie z zastosowaniem całych mikroorganizmów mają swoje wady i zalety. Z jednej strony eliminuje się koszty związane z wydzieleniem i oczyszczaniem konkretnych enzymów, zapewniona jest naturalna regeneracja kofaktorów niezbędnych dla funkcjonowania niektórych z nich, z drugiej zaś istnieje konieczność doboru odpowiedniej aparatury i warunków procesu najbardziej odpowiednich do wzrostu i funkcjonowania organizmu, a także izolacji produktu.

Doktorantka podjęła się trudnych badań nad możliwością zastosowania cyjanobakterii w procesie otrzymywania chiralnych β -hydroksyfosfonianów o potencjalnej aktywności biologicznej. Otrzymywanie chiralnych związków fosfonowych na drodze biotransformacji jest przedmiotem zainteresowania grupy badawczej prof. Ewy Żymańczyk-Dudy. Nowatorskie podejście Autorki polega na zastosowaniu mikroorganizmów fotosyntezujących, w odróżnieniu od innych prac, w których wykorzystywano głównie mikroorganizmy heterotroficzne.

Część pracy zatytułowana „Wstęp” zawiera bardzo starannie, jasno i niezwykle wyczerpująco zredagowany przegląd literatury z zakresu charakterystyki i zastosowania mikroalg (bibliografia zawiera w sumie 198 pozycji literaturowych, z czego w tej części Autorka cytuje 150 pozycji). Godna podkreślenia jest bardzo wnikliwa analiza doniesień literaturowych dotyczących z jednej strony zagadnień budowy, występowania i warunków hodowli cyjanobakterii a z drugiej ich wykorzystania. W rozdziale 3 Autorka szeroko opisuje możliwości zastosowania sinic i innych mikroalg w różnych dziedzinach. Rozpoczyna te rozważania od przeglądu procesów biotransformacji z udziałem cyjanobakterii. Doktorantka

skupia się przy tym na opisanych w literaturze reakcjach redukcji ugrupowania karbonylowego oraz modyfikacji struktur steroidów i monoterpenu. W kolejnych rozdziałach Autorka przedstawia komercyjny potencjał mikroalg jako źródła związków biologicznie aktywnych, ale przede wszystkim składnika suplementów diety i kosmetyków oraz dodatku do pasz i nawozów. Ciekawa jest również dyskusja na temat wykorzystania mikroalg jako surowca do produkcji biopaliw, gdzie Doktorantka przedstawia zarówno zalety jak i wady takiego rozwiązania. Rozważania kończy podrozdział „Bioremediacja”, w którym opisane zostało zastosowanie sinic w procesie usuwania metali ciężkich z zanieczyszczonego środowiska.

Tak bogaty przegląd literatury stanowi niezwykle wartościowe źródło informacji na temat budowy, warunków hodowli i zastosowania cyjanobakterii. Świadczy również o dużych umiejętnościach Doktorantki w zakresie odpowiedniego doboru i interpretacji danych literaturowych. Na podkreślenie zasługuje forma przedstawienia doniesień literaturowych w postaci syntetycznego opisu, ale przede wszystkim przejrzystych tabel i rysunków, co znacznie podnosi wartość przedstawionego materiału. Trochę zabrakło w tej części danych literaturowych z zakresu otrzymywania i zastosowania chiralnych związków fosfonowych, będących obiektem badań Doktorantki. Informacje dotyczące tego tematu znalazłam jednak w części badawczej.

Kolejna część „Cel pracy” zawiera jasno sformułowane założenia badawcze, zarówno ogólne jak i szczegółowe, przedstawione w punktach.

Rozdział „Badania własne” rozpoczyna opis syntezy substratów używanych później w procesie biotransformacji. Następnie Doktorantka podejmuje wnikliwą i ciekawą dyskusję poświęconą metodzie wyznaczania nadmiaru enancjomerycznego β -hydroksyfosfonianów oraz określenia ich konfiguracji absolutnej, z wykorzystaniem techniki NMR i chiralnych czynników derywatyzujących. W kolejnym rozdziale Autorka opisuje przygotowanie hodowli i charakterystykę wybranych, różnych morfologicznie 6 szczepów sinic, podając m.in. krzywe wzrostu. Stosuje trzy różne metody pomiaru przyrostu biomasy i wybiera najbardziej uniwersalną – zależność stężenia chlorofilu *a* od czasu. Przydatne byłoby tutaj uzasadnienie wyboru 21-dniowych hodowli sinic do procesów biotransformacji. Jak wynika z krzywych wzrostu, stężenie oznaczanego chlorofilu *a* było różne dla różnych szczepów.

W dalszej części Doktorantka omawia wyniki uzyskane w procesie biotransformacji kilku β -ketofosfonianów o różnej budowie, z zastosowaniem cyjanobakterii jako biokatalizatorów. W celu wyznaczenia najbardziej korzystnych warunków, przedstawia kolejno wpływ źródła światła i systemów oświetlenia, stosowanej pożywki oraz mieszania i napowietrzania na uzyskiwane rezultaty. Badania wykonuje na 3 szczepach, wykluczając pozostałe, ze względu na małą aktywność w badanym procesie. Po wstępnych badaniach stwierdza, że najlepsze wyniki uzyskuje się w reakcji redukcji 2-okso-2-fenylotetanofosfonianu dietylu wobec szczepu *Nodularia sphaerocarpa* (konwersja 98-99%; *ee*₅ 92-95%), przy czym wpływ źródła światła i systemu oświetlenia jest niewielki. Znikomy jest też wpływ składu stosowanej pożywki w tym przypadku. Uzyskane wyniki są bardzo interesujące, ze względu na fakt, że po raz pierwszy udało się otrzymać β -hydroksyfosfonian o takiej strukturze na drodze biotransformacji. Mogą one jednocześnie wskazywać na wysoką specyficzność substratową oksydoreduktazy ekspresjonowanej w badanym szczepie. Wprawdzie Doktorantka odwołuje się tutaj do danych literaturowych dotyczących wyizolowanych z cyjanobakterii enzymów, jednak w mojej opinii przydałoby się trochę więcej informacji z tego zakresu.

Większy wpływ składu podłoża hodowlanego oraz stosowanych składników odżywczych obserwuje Autorka dla innych badanych szczepów, szczególnie w procesie redukcji alifatycznych β -ketofosfonianów, uzyskując w większości wysokie nadmiary enancjomeru S produktu, ale jednocześnie niezbyt wysoki stopień przemiany substratu. Na podkreślenie zasługuje wnikliwa analiza wyników uzyskanych dla biotransformacji wobec szczepów cyjanobakterii hodowanych na różnych podłożach. Doktorantka dyskutuje m.in. wpływ pH i dodatku źródła azotu dla podłoża BG-11 i *Spirulina*. Nie znalazłam natomiast danych na temat pH podłoża Z8. W podsumowaniu wpływu różnych czynników na proces biotransformacji ketofosfonianów Autorka określa najbardziej korzystne warunki prowadzenia przemian poszczególnych substratów. Trochę zbyt odważne jest określenie tych warunków jako optymalnych.

W rozdziale 5.3. Doktorantka opisuje i analizuje wyniki uzyskane w procesie immobilizacji badanych szczepów cyjanobakterii, podając na początku najważniejsze zalety ale też wady takich biokatalizatorów. Immobilizacja całych komórek jest zadaniem trudnym, gdyż należy nie tylko dobrać właściwy nośnik, ale też zapewnić odpowiednie warunki i składniki odżywcze, co niejednokrotnie powoduje trudności w samym procesie unieruchomienia. Autorce udało się skutecznie wykonać immobilizację dwóch szczepów w alginianie wapnia, a po modyfikacji warunków procesu także trzeciego szczepu *Arthrospira maxima*. Wyniki biotransformacji odpowiednich ketofosfonianów wobec immobilizowanego szczepu *N. sphaerocarpa* są w większości tylko nieznacznie gorsze od uzyskanych dla wolnych komórek, co Doktorantka słusznie wiąże z możliwością utrudnionej dyfuzji reagentów oraz ograniczeniem dostępności światła. Autorka potwierdza jednocześnie możliwość wydajnej i selektywnej redukcji 2-okso-2-feniloetanofosfonianu dietylu do (S)-2-hydroksy-2-feniloetanofosfonianu dietylu wobec badanego katalizatora (konwersja 97%; ee_S 97% przy 1% stężeniu alginianu wapnia), co daje nadzieję na zastosowanie tej metody na większą skalę. Próby immobilizacji na powierzchni porowatych pianek poliuretanowych nie powiodły się.

Kolejnym wyzwaniem są próby powiększenia skali biotransformacji, co z punktu widzenia technologicznego jest istotnym i często trudnym etapem. Doktorantka nie tylko zwiększa objętość mieszaniny reakcyjnej, ale także bada wpływ typu stosowanego bioreaktora (płaskościennie wentylowane butelki, kolby Erlenmeyer'a, kolumny wypełnione immobilizowanym biokatalizatorem). Badania rozpoczyna od określenia wpływu ilości 2-okso-2-feniloetanofosfonianu dietylu na proces biotransformacji wobec *N. sphaerocarpa*. Stwierdza, że najbardziej korzystne jest stężenie 1-2 mM, powyżej którego znacznie obniża się stopień przereagowania substratu. Interesujące jest powiązanie tych badań z analizą żywotności komórek stosowanych cyjanobakterii. Brak wyraźnych zmian wraz ze wzrostem stężenia substratu sugeruje, że enzymy uczestniczące w procesie biotransformacji są raczej powiązane z metabolizmem wtórnym. Doktorantka stwierdza przy tym, że bardziej wiarygodne są wyniki otrzymane metodą cytometrii przepływowej (z zastosowaniem barwnika SYTOX Green) niż testu MTT. Autorka podejmuje również próbę wyjaśnienia takiej sytuacji. W wyniku podjętych prób zwiększenia skali procesu ze 100 ml do 500 ml Doktorantka wskazuje, że przy zastosowaniu szczepu *N. sphaerocarpa* najlepsze wyniki uzyskuje się stosując prosty reaktor okresowy (kolbę Erlenmeyer'a) oraz odpowiednie naświetlanie i wytrząsanie mieszaniny reakcyjnej. Interesujące są również wstępne badania z zastosowaniem kolumn wypełnionych immobilizowanym biokatalizatorem. Wprawdzie uzyskane stopnie przemiany są znacznie niższe niż dla hodowli okresowych wobec „wolnych” komórek, jednak można zauważyć, że dla procesów ciągłych bardziej korzystne jest

zastosowanie dłuższych kolumn o małej średnicy. W mojej opinii zastosowanie mniejszego natężenia przepływu mogłoby poprawić uzyskiwane wyniki. Rezultaty przedstawione w tym rozdziale dają ogólny pogląd na temat możliwości powiększenia skali procesu, wymagają jednak wielu badań dotyczących m.in. stabilności immobilizowanego biokatalizatora oraz optymalizacji warunków (natężenie przepływu, wymiary bioreaktora itp.).

Ciekawe jest umieszczenie w części badawczej nie tylko analizy uzyskanych przez Doktorantkę wyników, ale także opisanych w literaturze danych z tego zakresu. Pozwala to na szersze spojrzenie na poszczególne zagadnienia poruszane w pracy, bez konieczności powrotu do części literaturowej. Mimo, że jest to podejście niestandardowe, sprawiające wrażenie, że część literaturowa jest niekompletna, to jednak ma ono wiele zalet.

Rozdział „Podsumowanie” zawiera najważniejsze osiągnięcia uzyskane w trakcie badań oraz konkretne, przemyślane wnioski, co przy tak szerokim zakresie badań wymagało dużego wysiłku i wiedzy.

Liczne procedury i metody analityczne stosowane w pracy, zostały bardzo dokładnie opisane w części doświadczalnej.

Praca jest napisana bardzo starannie i jasno, jej układ jest czytelny, z zachowaniem prawidłowych proporcji poszczególnych rozdziałów. Strona merytoryczna nie budzi większych zastrzeżeń, ale, jak to zwykle bywa przy tak obszernej rozprawie, nie udało się uniknąć błędów edytorskich i pewnych skrótów myślowych.

Z obowiązku recenzenta podaję wybrane uwagi oraz nieścisłości, które zauważyłam podczas analizy recenzowanej pracy:

1. Str. 41 – powinno być $^{15}\text{NO}_3^-$; nie znalazłam w artykule 119 informacji na temat stosowania $^{14}\text{CO}_2$ i $^3\text{H}_2\text{O}$.
2. Str. 58-59 – Doktorantka podaje, że zastosowano fosforyn trójetylowy, tymczasem na Schemacie 1 podaje wzór fosforanu(V). To samo na str. 121.
3. Str. 67 – wykresy 3-8:
 - a. dla szczepu *Nostoc cf-muscorum* CCALA 129 podana jest krzywa zależności gęstości optycznej hodowli OD_{750} od czasu, a dla reszty zależność stężenia chlorofilu od czasu. Lepiej byłoby podać tę samą zależność dla wszystkich szczepów.
 - b. W przypadku szczepu *Geitlerinema sp.* CCALA 138 po ok. 17 dobach obserwuje się dość znaczny spadek stężenia chlorofilu (w pozostałych przypadkach ciągły wzrost). Doktorantka podaje, że do biotransformacji stosowano hodowle 21-dniowe. Czy taki przebieg i stosunkowo niskie stężenie chlorofilu mogły mieć wpływ na małą aktywność badanego szczepu w procesie biotransformacji?
4. Z literatury wynika, że niektóre szczepy cyjanobakterii są zdolne do rozszczepienia wiązania węgiel-fosfor. Czy w obecności któregoś z badanych w pracy szczepów obserwowano takie zjawisko?
5. Str. 77 – trochę niejasne jest tłumaczenie niższej czystości optycznej produktu 35 („aktywacja enzymów wykazujących przeciwną enancjosepcyficzność w zadanych warunkach”). Czy istnieją jakieś doniesienia literaturowe o możliwości ekspresji lub aktywacji innych enzymów przy zastosowaniu pożywki Z8? Może takie zmiany wynikają ze zmiany oddziaływań danego substratu z centrum aktywnym oksydoreduktazy w zastosowanych warunkach.
6. Str. 86 – Doktorantka pisze o możliwym hamującym wpływie β -ketofosfonianów na aktywność katalityczną systemu enzymatycznego komórek sinic, a następnie

podaje, że w celu ograniczenia lub wyeliminowania tego wpływu stosuje immobilizację biokatalizatora. Czy immobilizacja może wpłynąć aż tak znacząco na inhibicję substratową lub produktową enzymów?

7. Str. 99 – stwierdzenie o toksycznym wpływie 2-oksobutanofosfonianu dietylu na komórki *N. sphaerocarpa* przy wartości 12,2% komórek martwych w populacji i 10,2% w kontroli jest dyskusyjne, jeżeli wziąć pod uwagę błąd oznaczenia $\pm 2\%$.
8. Str. 103 – zastosowanie wyższego stężenia substratu (5 mM) w badaniach na skalę 500 ml jest zbędne, jeżeli wcześniej Doktorantka ustaliła, że już przy 4 mM następuje znaczne obniżenie stopnia przereagowania i wskazała na hamujący wpływ takiej ilości substratu na enzym/enzymy katalizujące reakcję redukcji.
9. Wybrane określenia niezbyt precyzyjne lub będące skrótami myślowymi (nie wymagają komentarza Doktorantki):
 - a. Str. 42 – niedokończone zdanie i błąd edytorski – „Wiele szczepów sinic wykazuje cechy, które sprawiają, że ten system biologiczny jest interesujący z energetycznego punktu”
 - b. Str. 43 – tabela 9 – „(20-50% mokrej suchej masy)” – mokrej czy suchej?
 - c. Str. 68 – „...pobierano próbkę zawiesiny hodowlanej i dokonywano pomiaru wzrostu”
 - d. Str. 85 – „niska wydajność redukcji alifatycznych substratów może wynikać z toksycznego wpływu testowanych ksenobiotyków na aparatus enzymatyczny komórki”
 - e. Str. 92 – zamiast odniesienia do podrozdziałów 5.4.1.-5.4.4. (części Materiały i Metody) powinno chyba być odniesienie do rozdziału 7 tej części pracy.
 - f. Str. 137 - „zimmobilizowane w alginianie wapnia.....”
 - g. Str. 139 – „niebiesko-białym światłem o zimnym odcieniu...”

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, posiada wysoki poziom merytoryczny oraz zawiera oryginalne i cenne wyniki badań nowych biokatalizatorów w reakcji redukcji ketofosfonianów. Doktorantka wykazała się dużymi umiejętnościami w wykorzystaniu i analizie danych literaturowych, planowaniu doświadczeń, ich realizacji oraz dojrzałym formułowaniu poprawnych wniosków. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres oraz interdyscyplinarny charakter rozprawy doktorskiej, obejmujący zarówno część biochemiczną jak i syntetyczną. Świadczy to o ogromnej pracy włożonej w realizację założonego na początku celu oraz o samodzielności i dojrzałości naukowej Doktorantki. Potwierdzeniem wartości przedstawionych wyników jest 6 publikacji, w tym artykuł w bardzo dobrym czasopiśmie Green Chemistry (IF 8,02; 2015), dwa zgłoszenia patentowe oraz prezentacje na 11 konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Uważam, że rozprawa doktorska pt. „Wykorzystanie sinic do otrzymywania chiralnych związków fosfonowych” spełnia wszystkie warunki merytoryczne i formalne określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, w związku z czym wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani mgr inż. Moniki Górak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę obszerny zakres pracy i jej wartość merytoryczną potwierdzoną publikacjami, zwracam się do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej z prośbą o wyróżnienie przedstawionej mi rozprawy doktorskiej.

Danuta Gillner