

Dr hab. Hubert Cieśliński
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Wydział Chemiczny
Politechniki Gdańskiej

Gdańsk, 30.09 – 07.10.2015 r.

RECENZJA

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

(promotor: Dr hab. inż. Ewa Żymańczyk-Duda, prof. PWR)

W okresie ostatnich dziesięciu lat nastąpiła intensyfikacja badań na polu poszukiwania nowych rozwiązań dla przemysłu poprzez poszukiwanie biokatalizatorów na potrzeby opracowywania biotechnologii mogących stanowić alternatywę dla procesów wykorzystujących tradycyjne katalizatory w syntezie chemicznej. Do zapoczątkowania tych badań przyczyniło się rosnące zapotrzebowanie przemysłu farmaceutycznego na wydajną syntezę związków chemicznych posiadających chiralne struktury jak i wymóg spełnienia zasad zrównoważonego rozwoju w procesach technologicznych. Obecnie na świecie prowadzone są liczne projekty naukowe, których celem jest identyfikacja nowych biokatalizatorów, zarówno w postaci całych komórek organizmów jak i enzymów z nich izolowanych, a następnie opracowanie metod umożliwiających ich praktyczne zastosowanie oraz rozwiązanie trudności związanych z zwiększaniem skali procesu. Recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Moniki Górak doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy. Poszukiwanie nowych oksydoreduktaz stanowiących po hydrolazach drugą z klas enzymów o największym przemysłem zastosowaniu jest polem, na którym prowadzone są intensywne badania. Do tej pory badania te jednak skupiały się na wykorzystaniu w tym celu drożdży, pleśni lub bakterii, jednak w przypadku bakterii badania te zasadniczo nie dotyczyły sinic. Dlatego, praca Pani mgr inż. Moniki Górak stanowi w mojej ocenie ważny krok na tym polu, rozpoczynający badania nad mało poznanym potencjałem biotechnologicznym aparatu enzymatycznego sinic.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska liczy 167 stron maszynopisu łącznie z bibliografią obejmującą 198 pozycji i zawiera 45 tabel, 20 rysunków i 17

wykresów. Tekst pracy podzielony jest na typowe rozdziały dla rozpraw naukowych z zakresu badań eksperymentalnych.

Pierwszy rozdział pracy zatytułowany *Streszczenie* w mojej ocenie spełnia swoje tytułowe zadanie. Nie mam do tego rozdziału zastrzeżeń.

W następnym rozdziale zatytułowanym *Wstęp*, został rzeczowo omówiony obecny stan wiedzy w zakresie badań istotnie łączących się z tematem rozprawy. Rozdział ten zawiera zwięzłe, lecz wyczerpujące omówienia informacji na temat charakterystyki cyjanobakterii oraz rozwiązań współcześnie wykorzystywanych do ich hodowli, a także hodowli innych mikroalg. W rozdziale tym, w sposób wyczerpujący zostały omówione najważniejsze osiągnięcia w zakresie ustalenia czynników wpływających na wydajność hodowli biomasy cyjanobakterii oraz zastosowania tych mikroorganizmów i innych mikroalg w procesach przemysłowych. Bardzo wartościowe dla czytelnika jest także omówienie komercyjnego potencjału sinic, ukazujące ich znaczenie dla rozwoju biogospodarki, jako teraźniejszego lub potencjalnego producenta związków aktywnych biologicznie, stosowanych przy produkcji leków, żywności czy też biopaliw III generacji, a także znaczenia tych organizmów dla opracowania nowych procesów bioremediacji wody i ścieków. Pozostałe ważne dla pracy informacje dotyczące charakterystyki sinic i systemów hodowli mikroalg zostały zwięzłe aczkolwiek w stopniu wystarczającym omówione w tym rozdziale. Mam jednak kilka uwag do tego rozdziału. Z analizy treści pierwszego akapitu *Streszczenia* wynika, że obecnie metody biologiczne redukcji ketonów są oparte na wykorzystaniu w tym celu niefotosyntetyzujących i heterotroficznych mikroorganizmów lub wyizolowanych i oczyszczonych z nich enzymów. Stąd oczekiwałem rozwinięcia tej myśli w rozdziale zatytułowanym *Wstęp*. Niestety, w tym rozdziale informacja ta w nieomal niezmienionej formie została jedynie powtórzona w pierwszym akapicie na stronie 19. Osobiście uważam to za zbyt duże uproszczenie, ponieważ rozwinięcie tej myśli i przedstawienie krótkiego omówienia stanu tych badań jest ważne dla uchwycenia we właściwym świetle szczegółowo omówionego stanu badań nad wykorzystaniem w tym samym celu cyjanobakterii (podrozdział 3.1). Ponadto, w tej części pracy, na stronie 18, w ostatnim akapicie autorka stwierdza, cytując: „Asymetryczna redukcja ketonów jest jedną z najważniejszych i praktycznych reakcji stosowanych w produkcji nieracemicznych chiralnych alkoholi, które mogą być następnie transformowane podczas syntezy do ważnych przemysłowo związków chemicznych tj. farmaceutyków czy agrochemikaliów”. Niestety, myśl ta nie została

rozwinięta. Nie zostały przedstawione dane obrazujące, o jakie konkretnie farmaceutyki i agrochemikalia autorce chodzi. Co więcej, w tym miejscu poza przedstawieniem przykładów konkretnych ważnych przemysłowo związków należących do tej grupy należało by też przedstawić dane na temat obecnego i przyszłego zapotrzebowania rynkowego na te przykładowe związki. W moim osobistym odczuciu, przedstawienie tych dodatkowych informacji pozwoliłoby lepiej zrozumieć czytelnikowi tej pracy, wagę badań autorki przedstawionych w rozdziałach zatytułowanym *Badania Własne*.

Mniej istotna uwaga dotyczy sensu zdania ze strony 19, które brzmi, cytuje: "Jednak w porównaniu do najczęściej stosowanych biokatalizatorów – bakterii, grzybów oraz drożdży, sinice stanowią słabo poznaną grupę mikroorganizmów." Autorka bardzo nieprecyzyjnie wyraziła się w tym zdaniu, poprzez użycie zbyt obszernych terminów tj „bakterie” i „grzyby” łącznie z terminami o zdecydowanie węższym znaczeniu tj. sinice – które są grupą bakterii autotroficznych, oraz drożdże, które są grupą jednokomórkowych grzybów. W związku z tym należało by doprecyzować o jako grupę bakterii innych niż sinice autorce chodziło w tym zdaniu. Natomiast, zamiast zwrotu „grzyby oraz drożdże”, w mojej ocenie powinien być użyty zwrot „grzyby w tym drożdże” pokazujący właściwe logiczne umiejscowienie drożdży w obrębie szerokiego pojęcia jakim jest termin grzyby.

Kolejna uwaga dotyczy błędu rzeczowego znajdującego się na stronie 25 w trzecim akapicie. W tym miejscu autorka pisze: „...niezbędnymi do prawidłowego wzrostu sinic są jony S, K, Na, Fe, Mg, Ca zaś mikroelementami jony B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, V, Se ...”. Po pierwsze autorka użyła zapisu symboli pierwiastków, po drugie nie podała o jakie konkretnie jony chodzi dla tych pierwiastków np. siarki czy kobaltu, które mogą występować w jonach na różnych stopniach utlenienia. Po trzecie kiedy piszemy o mikroelementach w domyśle już jest wiadomym, że chodzi o pierwiastki, a nie jony, stąd uważam zwrot „zaś mikroelementami jony” za błąd rzeczowy i logiczny.

Moja ostatnia uwaga względem danych przedstawionych w omawianym rozdziale dotyczy Wykresu 1. Na wspomnianym wykresie, obrazującym skale zastosowania poszczególnych klas enzymów w biokatalizie, autorka udział oksydoreduktaz oceniła na równe **25%**. Natomiast w akapicie bezpośrednio pod tym wykresem, autorka podaje, że udział ten wynosi **około 30%**. W mojej ocenie te dwie wartości jednak zbyt od siebie odbiegają.

Podsumowując, pomimo zgłoszonych uwag, uważam, że rozdział wstęp spełnił swoje zadanie bardzo dobrze. O mojej bardzo wysokiej ocenie tego rozdziału zdecydował zakres, aktualność (tj. cytowania jak najbardziej aktualnego piśmiennictwa) i sposób przedstawienia informacji w podrozdziałach 2 i 3. Także, wysoko oceniam fakt podania przez autorkę w tym rozdziale informacji na temat ośrodków naukowych w Polsce, w których prowadzi się badania nad zastosowaniem mikroalg.

W kolejnym króciutkim jednostronicowym rozdziale autorka przedstawiła jasno i zwięźle główny cel oraz szczegółowe cele pracy. Nie mam zastrzeżeń do sformułowanych celów, a wybór celów szczegółowych uważam za dobrze przemyślany.

W następnym rozdziale zatytułowanym *Badania własne*, liczącym 50 stron, autorka pracy przedstawia wykonane eksperymenty oraz omawia i analizuje uzyskane wyniki. Opis wyników jest bardzo dobrą częścią dysertacji – autorka wnikliwie komentuje rezultaty kolejnych doświadczeń, które stanowią logicznie zaplanowany ciąg badań. Co ważne dla mnie, autorka w celu lepszego zrozumienia przez czytelnika dokonanej przez nią wyboru metod eksperymentalnych dość szczegółowo omawia niektóre z nich tak jak np. w podrozdziale 3 czyni to dla metod służących do wyznaczenia nadmiaru enancjomerycznego oraz konfiguracji absolutnej β -hydroksyfosfonianów. Uważam to za dobrą decyzję. Za szczególnie wartościowe i trafne uważam wykonanie przez autorkę badań, w celu wyznaczenia krzywej wzrostu hodowli sinic z wykorzystaniem różnych alternatywnych metod. Było to właściwe podejście m.in. ze względu na fakt użycia w badaniach szczepów sinic znacząco różniących się morfologią i wielkością komórek (Rysunek 18). W sposób przemyślany zostały też wybrane do zbadania te parametry hodowli, które są ważne dla optymalizacji procesu biotransformacji. Sposób przeprowadzenia tych eksperymentów (podrozdział 5.2), uważam za właściwy i zgodny z rozwiązaniami wcześniej przyjętymi w literaturze przedmiotu. Za ważne dokonanie dla tej pracy, uważam wykonanie przez autorkę badań nad zwiększaniem skali szczególnie obiecującego procesu biotransformacji β -ketofosfonianów z zastosowaniem komórek *N. sphaerocarpa* oraz określenie żywotności komórek tych sinic w warunkach biotransformacji przy różnym stężeniu badanych ksenobiotyków.

Podsumowując, uważam, że autorka przedstawiła przekonujący opis wykonanych badań, oraz osiągnęła wyznaczone cele szczegółowe. Do tego

rozdziału, jednakowoż, mam następujące uwagi. W rozdziale 5.4 autorka stwierdza, że: „Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do kontynuacji badań i podjęcia próby zwiększenia skali najefektywniejszego procesu – redukcji 2-okso-2-fenylloetanofosfonianu dietylu **34** z zastosowaniem komórek *N. sphaerocarpa*”. Niestety, autorka nie jest konsekwentna, bo odbiega od tego założenia prezentując w podrozdziale 5.4.2, pierwszy akapit na stronie 102, także wyniki zwiększenia skali procesu metodą B dla biotransformacji 2-oksopropanofosfonianu dietylu **32** oraz 2-oksobutanofosfonianu dietylu **33**. Dla odmiany, w metodach C i D autorka postępuje w zgodzie z przedstawionym powyżej założeniem badawczym. Poza tą uwagą, w moim odczuciu legendy do wykresów 9 i 10, zamieszczonych w omawianym rozdziale, powinny zawierać także krótką informację, co przedstawiają oba rodzaje wykresów słupkowych. Pozwoliłoby to po prostu na łatwiejszą analizę i zrozumienie przedstawionych wyników przez czytelnika, bez potrzeby poszukiwania opisu tych wyników w tekście pracy.

Z reguły w pracach doświadczalnych, w tym w pracach doktorskich, jednym z bardzo ważnych rozdziałów jest zwykle Dyskusja. Treści i sposób napisania Dyskusji często decyduje o wartości pracy i jej naukowym przesłaniu. W przypadku **pracy** doktorskiej mgr inż. Moniki Górak, takiego rozdziału w pracy nie ma. Autorka postanowiła prowadzić dyskusje bezpośrednio w tych miejscach pracy, w których omawia wyniki. W przypadku recenzowanej pracy doktorskiej, po zastanowieniu i uwzględnieniu zdecydowanie nowatorskiego charakteru badań autorki, takie rozwiązanie uznaję za właściwe. Dzięki takiemu rozwiązaniu każdy z podrozdziałów kończy się przedstawieniem wniosków na podstawie, których autorka dokonuje racjonalnych wyborów co do kierunku dalszych badań. Tę „ścieżkę” obrazującą przebieg badań najlepiej widać w krótkim 4 stronicowym rozdziale zatytułowanym *Podsumowanie*, w którym autorka w sposób zwięzły i rzeczowy przytacza najważniejsze wnioski wypływające z jej badań.

Część metodyczna, opisująca materiały i metody wykorzystane w badaniach liczy 29 stron. Dobór metod użytych w pracy oceniam jako prawidłowy. W rozdziale tym znalazły się także rzetelne opisy autorskich metod optymalizacji skali procesu biokonwersji ksenobiotyku **34** z wykorzystaniem komórek *N. sphaerocarpa* (metody A-D) opracowanych na potrzeby tej pracy. Opis wszystkich użytych metod jest w mojej ocenie wystarczająco precyzyjny dla ewentualnego powtórzenia doświadczeń.

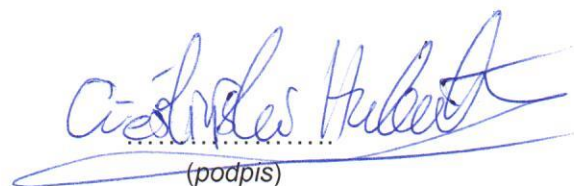
Na zakończenie swojej recenzji pragnę przedstawić ocenę języka i warstwy edycyjnej pracy. Praca Pani Moniki Górak od strony edytorskiej jest przygotowana bardzo staranie. Tabele, rysunki i wykresy są wkomponowane w tekst pracy we właściwych miejscach. Ponadto są one bardzo czytelne, chociaż nie dotyczy to Tabeli 1, gdzie w dwóch pierwszych rzędach oraz ostatnim rzędzie pod strukturami związków chemicznych nie ma ich nazw w przeciwieństwie do pozostałych struktur związków chemicznych zaprezentowanych w tej tabeli, które są opatrzone właściwymi nazwami. W całej pracy znalazłem zaledwie kilka błędów gramatycznych (użycie słów w nieprawidłowej odmianie), a także błędów składniowych zdania. Sama praca jest napisana bardzo dobrym językiem polskim. Przekaz treści merytorycznych jest całkowicie zrozumiały. Na tą bardzo dobrze napisaną pracę cieniem jednak kładzie się użycie przez autorkę niewłaściwej konwencji zapisu „separatora dziesiętnego” w podawanych w wielu miejscach pracy wartościach liczbowych. Autorka pracy w tym celu konsekwentnie używa **kropki** podczas gdy w języku polskim prawidłowym znakiem interpunkcyjnym dla zapisu „separatora dziesiętnego” jest **przecinek**. Podejrzewam, że autorka pracy zasugerowała się nieświadomie, użyciem w tym celu **kropki** w anglojęzycznej literaturze. Mimo wszystko jest to błąd interpunkcyjny, na który pragnę uczulić autorkę. Odnosząc się na końcu do stylu języka pracy mam jedną uwagę. W kilku miejscach pracy np. 3 akapit na stronie 87 lub 2 i 3 akapit na stronie 106 przy formułowaniu wniosków wynikających z analizy uzyskanych wyników, autorka pracy używa czasownika zwrotnego „wydaje się”. Uważam to za błąd ponieważ czasownik zwrotny „wydawać się” służy do formowania sądów o przedmiotach, zjawiskach, ludziach w oparciu o subiektywne odczucia, wrażenia, na których poparcie brakuje jednoznacznych dowodów takich jak np. wyniki przeprowadzonych eksperymentów. W moim odczuciu przedstawione wyniki uprawniają autorkę w wskazanych miejscach pracy do sformułowania jednoznacznych wniosków.

Analiza treści przedstawionych powyżej uwag i zastrzeżeń wyraźnie wskazuje, że znakomita większość z nich ma charakter formalny, a nieliczne uwagi merytoryczne mają charakter przedstawienia problemu do dyskusji. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawiona rozprawa zawiera istotne elementy nowości naukowej. Pani Monika Górak wykazała się przy tym wiedzą teoretyczną w zakresie tematyki prowadzonych badań, a także umiejętnością projektowania doświadczeń i interpretacji ich wyników. Uzyskane przez Doktorantkę rezultaty

stanowią cenny wkład w rozwój badań nad stosunkowo słabo poznanym potencjałem sinic jako biokatalizatorów w procesach biokatalitycznych opracowywanych na potrzeby przemysłu. Doceniam w całej pełni ogrom badań i wysiłku, który musiała Doktorantka włożyć w jej wykonanie. Należy także docenić dorobek naukowy Doktorantki, jest współautorem 6 publikacji w czasopismach, 2 zgłoszeń patentowych i 11 komunikatów zgłoszonych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595). Na podstawie powyższego wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Górak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto uwzględniając nowatorski charakter badań w zakresie potencjału biotechnologicznego sinic, osiągnięte wyniki oraz dorobek autorki ze szczególnym uwzględnieniem faktu opublikowania wyników badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie w cenionym periodyku naukowym *Green Chemistry*, uważam, że rozprawa Pani mgr inż. Moniki Górak zasługuje na wyróżnienie.


(podpis)