

Dr hab. Mariusz Trytek, prof. uczelni
Zakład Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS
mariusz.trytek@mail.umcs.pl

Lublin, 10.10.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Śliżewskiej
pt. „*Ocena właściwości katalitycznych sinic*” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Ewy
Żymańczyk-Dudy w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Politechniki
Wrocławskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pod tytułem „*Ocena właściwości katalitycznych sinic*” dotyczy zastosowania biomasy cyjanobakterii w reakcjach biotransformacji nierozpuszczalnych w wodzie związków, takich jak octan 1-fenyloetylu, styren i epoksytyren.

Cyjanobakterie potocznie zwane sinicami, to gromada organizmów samożywnych, dawniej uznawanych za glony, według nowszej taksonomii zaliczanych do królestwa *Procaroyota*. Uznawane są za jedne z najstarszych ewolucyjnie organizmów. Pod względem morfologicznym cyjanobakterie mogą występować w formie jednokomórkowej, wielokomórkowej w postaci trychomów i nici lub jako kolonie jednokomórkowe i nitkowate. Znaczna część badań aplikacyjnych dotycząca cyjanobakterii poświęcona jest produkowaniu przez nie związków, bowiem mikroorganizmy te wytwarzają szereg metabolitów wtórnych o aktywności biologicznej. Są wśród nich związki o właściwościach chemioterapeutycznych, ale także związki wykazujące właściwości neurotoksyczne i hepatotoksyczne. Cyjanobakterie stanowią atrakcyjną alternatywę dla standardowych mikroorganizmów używanych w przemyśle chemicznym. Ze względu na zdolność cyjanobakterii do tlenowej fotosyntezy, ich zastosowanie umożliwia poprawę ekonomiki procesów chemicznych i biotechnologicznych poprzez ograniczenie stosowania zewnętrznych źródeł węgla i energii, a dodatkowo przyczynia się do ograniczenia emisji CO₂ do atmosfery. Łącząc cechy typowych biokatalizatorów z możliwością wytwarzania związków organicznych na drodze fotosyntezy cyjanobakterie są korzystnym rozwiązaniem dla zrównoważonej biotechnologii.

Cyjanobakterie postrzegane są jako mikroorganizmy o interesującym potencjale biokatalitycznym. Większość badań opisanych w literaturze dotyczy zastosowania w tym celu sinic z rodzaju *Spirulina* i produkowanych przez nie enzymów, np. lipaz. Jak dotąd nieznanne są reakcje biotransformacji przy użyciu cyjanobakterii w skali przemysłowej. Decyduje o tym szereg czynników, m.in. to, że hodowle akseeniczne tych mikroorganizmów bywają często kłopotliwe. Dlatego też, zadanie jakiego podjęła się Pani mgr Agnieszka Śliżewska – poznanie aktywności biokatalitycznej sinic wobec trzech ksenobiotycznych substratów, nie należało do łatwych.

Praca Pani mgr inż. A. Śliżewskiej idealnie wpisuje się w nurt badań nowych biokatalizatorów do zastosowania w syntezie farmaceutyków i innych produktów o wartości dodanej. Doktorantka postanowiła określić aktywność biokatalityczną sinic w reakcji enancjoselektywnej hydrolizy octanu 1-fenyletylu stosując je w postaci całych komórek i sprawdzić czy zróżnicowanie morfologiczne w obrębie tego samego gatunku wpływa na jego aktywność hydrolazową. Zbadała także przebieg hydrolizy chiralnego epoksydu jakim jest epoksystryren i podjęła próbę określenia potencjału oksydoredukcyjnego sinic wobec wiązania podwójnego styrenu.

Oceniana rozprawa doktorska przygotowana jest według zasad przyjętych dla dysertacji na stopień naukowy doktora w zakresie nauk eksperymentalnych. Praca liczy łącznie 198 stron, została podzielona na 4 główne rozdziały, w ramach których wydzielono 23 podrozdziały; zawiera Streszczenie, 32 stronicowe Wprowadzenie, 3 strony opisu Celu badań, 27 stron opisu Materiałów i metod. Omówienie wyników i elementy dyskusji przedstawiono łącznie w Części eksperymentalnej liczącej 84 strony. Prace kończą: 6 stronicowe Podsumowanie, Spisy 57 tabel, 71 rysunków, 14 schematów i 14 wykresów oraz Bibliografia.

Wprowadzenie zawiera przegląd aktualnego stanu wiedzy w przedmiocie charakterystyki ogólnej sinic i ich zastosowania, m.in w roli biokatalizatorów. W mojej opinii, podrozdziały 1.2 *Metabolity wtórne* i 1.3 *Związki biologicznie aktywne* powinny być połączone, bowiem większość metabolitów wtórnych to związki wykazujące biologiczną aktywność i odwrotnie, wśród związków biologicznie aktywnych istnieje duża grupa metabolitów wtórnych o działaniu antybiotycznym i antynowotworowym. W tej części pracy zabrakło opisu poznanych dotąd szlaków metabolizmu ksenobiotyków przez cyjanobakterie. Czy wiadomo coś na temat szlaków metabolizmu lub biodegradacji 1-fenyletylu, styrenu czy epoksystryrenu? Jeśli w literaturze takich informacji jest niewiele, mogło to być podkreślone przez Doktorantkę, tym bardziej, że głównym celem jej badań było „*rozszerzenie wiedzy na temat sinic, poprzez poznanie ich aktywności katalitycznej wobec ksenobiotycznych substratów*”.

Cel badań jest logicznie i jasno przedstawiony, zawiera osiem tez badawczych, z których sześć zostało udowodnionych w wyniku przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów. Pani mgr Śliżewska na początku wyznaczyła i poprawnie zinterpretowała krzywe wzrostu ośmiu hodowanych szczepów. Wykazała, że czas biotransformacji, stężenie substratu, sposób hodowli sinic czy też ich

zróznicowanie morfologiczne mają znaczący wpływ zarówno na stopień przereagowania substratu, jak i na enancjoselektywność reakcji biotransformacji. Zaobserwowała ponadto, że wydajność i enancjoselektywność hydrolizy racemicznego octanu 1-fenylloetylu istotnie zależy od sposobu naświetlania hodowli. Przy ograniczeniu dostępu światła do hodowli *Synechococcus bigramulatus* i wyższych stężeniach substratu (4-10 mM) nastąpił znaczny wzrost czystości optycznej mieszaniny produktów (odwrotną zależność wykazano w przypadku szczepu *Nostoc cf-muscorum*). Wyniki sugerują, że powyższa reakcja może być różnie powiązana z przebiegiem fotosyntezy w zależności od gatunku sinic – co może stanowić interesujący temat dalszych badań. Interesujące i perspektywiczne wydają się również badania nad wpływem zmian morfologii komórek szczepów sinic na ich aktywność biokatalityczną. Szkoda tylko, że zabrakło tu klarownego uzasadnienia dla podjęcia tego tematu oraz dyskusji nad tym jakie formy komórkowe sinic (o rozprostowanych trychomach czy spiralnej budowie) są najbardziej korzystne pod względem efektywności biokatalitycznej. Wyjaśnienie tego zjawiska byłoby bardzo przydatne w kontekście doboru i sposobu hodowli tych biokatalizatorów, jak i projektowania warunków reakcji biotransformacji. Jeżeli Doktorantka będzie w przyszłości zajmować się tym problemem, warto byłoby zbadać czy różnice w morfologii komórek są powiązane z aktywnością enzymów zaangażowanych w proces biotransformacji, i czy wpływają one na biodostępność hydrofobowych reagentów wobec centrów katalitycznych enzymów.

Na uwagę zasługują doświadczenia dotyczące określenia przeżywalności sinic w warunkach biotransformacji przy użyciu cytometrii przepływowej. Pozostaje jednak pewien niedosyt, ze względu na brak rozwinięcia dyskusji wyników otrzymanych w tym interesującym eksperymencie. W ramach tezy badawczej nr 6 *Określenie przeżywalność biokatalizatora w procesie biotransformacji*, oprócz stężenia substratu, można było również uwzględnić wpływ produktów biotransformacji na przeżywalność cyjanobakterii.

Nie udało się Doktorantce wykazać aktywności badanych szczepów sinic w biokatalitycznej hydrolizie epoksystryrenu, aczkolwiek podjęcie tego zadania było w pełni uzasadnione, gdyż w literaturze opisane są mikroorganizmy wykazujące takie uzdolnienia, np. bakterie *Sphingomonas* wytwarzające hydrolazę epoksydową. Sądzę, że określenie przeżywalności biokatalizatorów *Synechococcus bigramulatus* wobec styrenu i *Leptolyngbya foveolarum* wobec epoksystryrenu (tak jak to było wykonane wobec octanu fenylloetylu) dałoby odpowiedź czy brak obserwowanej aktywności sinic w biotransformacji tych substratów wynikał z ich toksycznego działania czy po prostu badane szczepy nie wykazywały aktywności w tym zakresie. Czy Doktorantka zastanawiała się nad tym problemem?

Dyskusja została przeprowadzona prawidłowo, niemniej jednak uważam, że wyniki przedstawionych badań stanowiły podstawę do przeprowadzenia bardziej wnikliwej analizy, w której można było dokonać oceny wyników badań własnych w konfrontacji z rezultatami uzyskanymi przez

innych autorów. Aczkolwiek trzeba przyznać, że Pani mgr A. Śliżewska miała utrudnione zadanie, ponieważ badaniami nad zastosowaniem sinic w biotransformacji hydrofobowych ksenobiotyków (takich jak styren, epoksytyren i octanu 1-feniloetyl) zajmowało się do tej pory niewielu autorów. Można było jednak odnieść się do badań nad innymi grupami drobnoustrojów. Takie porównanie pozwoliłoby ocenić czy rzeczywiście „*testowane szczepy cyjanobakterii prowadzą procesy biokonwersji bardzo szybko*” (str.141).

Najprawdopodobniej ze względu na dużą złożoność badań, i prowadzenie ich równolegle na kilku szczepach, do opisu metodyki oraz przy omawianiu wyników wkraść się spory chaos oraz pojawiło się kilka nieścisłości.

1. Niektóre podrozdziały w części metodycznej i eksperymentalnej niepotrzebnie zostały podzielone na kolejne podpunkty. Na przykład podrozdziały nr 20.3.2, 20.4.2 i 20.5.2 o tym samym tytule „*Wpływ zmiany sposobu naświetlenia hodowli na szybkość i efektywność procesu biotransformacji*” oraz podrozdziały nr 20.3.1, 20.4.1 i 20.5.1 („*Biotransformacje*”) powinny tworzyć jeden wspólny podrozdział zawierający opis wyników i dyskusję dla wszystkich badanych w tym celu szczepów.

Również w rozdziale 22 niepotrzebnie wydzielono dwa podrozdziały, które zawierają dużo informacji powielonych z części metodycznej.

2. Uważam, że podrozdział 17, przedstawiający wyniki dotyczące walidacji metody GC nieco rozprasza analizę wyników dotyczących samego procesu biotransformacji. Niektóre dane, jak np. te zawarte w tabelach 17-37, mogły być umieszczone na końcu pracy w materiałach uzupełniających. Informacja o tym, że wszystkie otrzymane parametry mieszczą się w rekomendowanych granicach jest wystarczająca.

3. Dużo zamieszania wprowadza podrozdział 21 „*Indywidualny dobór warunków biotransformacji racemicznego octanu 1-feniloetylu...*”, który wydzielono dopiero pod koniec pracy. W istocie określono w nim jedynie czas biotransformacji z uwzględnieniem stopnia konwersji substratu na poziomie 50% dla trzech wybranych szczepów. Można było te wyniki przedstawić wcześniej albo przynajmniej we wprowadzeniu do tego podrozdziału, wymienić nazwy szczepów i uzasadnić dlaczego ponownie postanowiono przebadać ich aktywność biokatalityczną. Niezrozumiałe jest także, dlaczego zdecydowano się w tym doświadczeniu na prowadzenie procesu biotransformacji w kolbach Erlenmayera, a nie w butelkach hodowlanych, które w poprzednich doświadczeniach okazały się lepszym rozwiązaniem ze względu na większą powierzchnię naświetlania.

Chciałbym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do innych uwag i odpowiedź na kilka dodatkowych pytań:

Wprowadzenie

4. W tabeli 1 (str. 20) wśród związków biologicznie aktywnych pochodzących z cyjanobakterii wyszczególniono inhibitory proteaz. Zabrakło w treści tego rozdziału krótkiej informacji na temat funkcji i praktycznego znaczenia tego rodzaju związków.

5. Przy omawianiu znaczenia zredukowanych dinukleotydów NAD(P)H w reakcjach redox katalizowanych przez sinice, można było uwzględnić udział tych kofaktorów w reakcjach przedstawianych na poszczególnych schematach. Czy wiadomo jakie oksydoreduktazy cyjanobakterii uczestniczą w tego typu reakcjach?

6. Chciałbym zwrócić uwagę, że ABE nie jest procesem trzystopniowym (s.40), to skrótowa nazwa fermentacji węglowodanów przez bakterie beztlenowe z rodzaju *Clostridia*, prowadzącej do wytwarzania mieszaniny acetonu, butanolu i etanolu.

Cel badań

7. W mojej opinii zaprojektowana w ramach tej pracy komora hodowlana zapewnia tylko częściowo niezmiennie warunki hodowli, ponieważ te zmieniają się wraz z wykorzystaniem składników podłoża i CO₂ przez cyjanobakterie. Zachowanie stałych warunków hodowlanych mogłaby zapewnić hodowla w chemostacie.

8. Doktorantka w jednym z celów szczegółowych postanowiła opracować i przeprowadzić walidację analitycznej metody oznaczania produktów biotransformacji. Jest to istotny punkt jej badań, a przedstawione wyniki świadczą o dużym nakładzie pracy włożonej w ich otrzymanie i zarazem o rzetelnym warsztacie badawczym Doktorantki. Wykonała szereg obliczeń różnych parametrów w celu sprawdzenia czy zastosowana metoda odpowiada zakresom wartości referencyjnych. Chciałbym zapytać o powody i ograniczenia, które kryły się za niewykorzystaniem już istniejących metod chromatograficznego oznaczania badanych związków. Brakuje informacji jakiego oprogramowania używano do archiwizowania, integrowania chromatogramów i liczenia pól powierzchni pików?

Materialy i metody

9. Przy wykazie odczynników zwykle podawana jest ich czystość chemiczna.

10. Na jakiej podstawie dobrano rodzaj podłoża (BG-11 i SM) do hodowli poszczególnych szczepów?

11. Czasami nie wiadomo według jakiego kryterium były dobierane jedne, a pomijane inne szczepy sinic na poszczególnych etapach badań; np. biotransformację styrenu i epoksytyrenu przeprowadzano przy użyciu różnej liczby szczepów, w badaniach przesiewowych nad biotransformacją octanu 1-fenyletanolu nie pokazano wyników dla *N. moravica* (uwzględniono je dopiero pod koniec pracy w rozdziale 21), zaś wśród szczepów, dla których określono wpływ długotrwałego przechowywania na

biotransformację znalazł się *Limnospira maxima*, a nie *Limnospira indica*, który wykazywał wyższą aktywność biokatalityczną. Ponadto, w tabeli nr. 6 wymieniono 8 szczepów wykorzystanych w badaniach, podczas gdy w streszczeniu i celu badań jest mowa o siedmiu szczepach.

12. Po ekstrakcji podłoży octanem etylu, odparowywano próby pod zmniejszonym ciśnieniem. Jak kontrolowano straty substratów i produktów. W jakim rozpuszczalniku rozpuszczano zatężone produkty przed analizą GC?

13. Na podstawie skanowania spektralnego, do pomiaru gęstości hodowli wybrano długość fali $\lambda = 685$ nm, która odpowiada absorpcji chlorofilu. Pomiar spektrofotometryczny opierał się więc równocześnie na rozproszeniu i absorpcji światła przez komórki. Czy metoda zastosowana do wyznaczenia krzywych wzrostu może być nazwana „*metodą turbidymetryczną*”? Chciałbym poznać opinię Doktorantki na ten temat.

14. Uważam, że sporządzenie krzywej wzrostu dla *Kamptonema animale* na podstawie danych literaturowych dotyczących stężenia chlorofilu oraz obliczonej liczby komórek dla szczepu *Synechococcus bigranulatus* nie było zabiegiem prawidłowym.

15. Doktorantka wykazała bardzo praktyczne podejście do problemu zmiany aktywności biokatalitycznej badanych szczepów w czasie ich długotrwałego przechowywania, porównując wydajności biotransformacji z użyciem szczepów pasażowanych przez 10 lat i nowo zakupionych szczepów. Jednakże nie jest jasne, dlaczego przeszczepiane co 21 dni szczepy sinic, były za każdym razem hodowane w różnych warunkach (i narażane na stres), co niewątpliwie determinowało właściwości fizjologiczne i katalityczne otrzymywanego inokulum. Czy takiego pasażowania nie można było wykonać w stałych warunkach hodowlanych? Proszę o wyjaśnienie tej kwestii.

16. W celu porównania aktywności biokatalitycznej szczepów nowych i pasażowanych przez 10 lat, analiza przebiegu reakcji biotransformacji powinna być wykonana w tych samych odstępach czasowych.

17. Czy w procesie biotransformacji używano za każdym razem tą samą ilość biokatalizatora? Warto było sprawdzić czy sucha biomasa cyjanobakterii się nie zmienia po 21-dniowej hodowli.

18. Brak informacji co do ilości powtórzeń przeprowadzanych hodowli i reakcji biotransformacji, brak także wartości odchyłeń standardowych dla otrzymanych wyników.

Część eksperymentalna

19. W części eksperymentalnej przy omawianiu wyników wielokrotnie powtarzane są te same wnioski, a także szczegółowe informacje metodyczne zawarte już w rozdziale „*Materiały i metody*”. Moim zdaniem praca zyskałaby bardziej na wartości gdyby wyniki własne doświadczeń opisano na tle aktualnego stanu wiedzy.

20. Skoro w warunkach abiotycznych stwierdzono niską stabilność styrenu i epoksystyrenu, co

przejawiało się powstawaniem znacznych ilości nieznanych produktów w podłożach hodowlanych, to moim zdaniem, przeprowadzenie biotransformacji tych związków było bezzasadne. Doktorantka powinna najpierw wykonać analizę jakościową produktów, w celu właściwej interpretacji wyników.

21. Który pik na chromatogramie (Rys. 8) odpowiada za epoksystryren? Czy właściwie została zinterpretowana stabilność substratu? Jakie związki zdaniem Doktorantki mogły powstać w wyniku inkubacji w podłożach hodowlanych (bez biokatalizatora)?

22. Octan 1-fnyloetylu okazał się także niestabilny w podłożu SM w trakcie 24-h inkubacji w warunkach abiotycznych ulegając hydrolizie do 1-(R) i 1-(S)-fnyloetanolu. Czy produkty jego hydrolizy nieenzymatycznej były uwzględniane w obliczeniach stopnia biokonwersji? Doktorantka mogła pokazać chromatogramy prób kontrolnych i prób właściwych również po 72 godz. inkubacji, gdyż po tym czasie określała stopień biokonwersji i nadmiar enancjomeryczny produktów.

23. Doktorantka pisze, że zaobserwowała dodatkowy sygnał analizując produkty biotransformacji octanu 1-fnyloetylu (s. 124-126); mogła to udokumentować zamieszczając przykładowy chromatogram. Ponadto stwierdza, że po 48 godz. 1-fnyloetanól „pozostaje stabilny w mediach hodowlanych” (s. 128), nie pokazując jednak odpowiedniego chromatogramu tego związku po tym czasie inkubacji.

24. Nie jest jasne jaki substrat użyto w celu identyfikacji tego dodatkowego produktu. W metodyce nie znalazłem informacji na ten temat, a podrozdział 16.3.2 (do którego znajdujemy odsyłacz na str. 126) zawiera inne dane. Z opisu tabeli 39 wynika, że był to 1-fnyloetanól.

25. Wartościowym wątkiem badań była próba określenia wpływu sposobu naświetlania hodowli na aktywność katalityczną szczepów w reakcji hydrolizy racemicznego octanu 1-fnyloetylu. Mam jednak pewne wątpliwości co do planu i przebiegu tych doświadczeń. Wszystkie warunki (poza sposobem naświetlania/intensywnością) w tych doświadczeniach powinny być identycznie. Tymczasem użyto dwóch różnych rodzajów naczyń (kolbę Erlenmayera i butelkę do hodowli komórkowych), czego konsekwencją były różne ilości CO₂ i O₂ w przestrzeni nad podłożami hodowlanymi, dostępne dla komórek sinic. Ponadto, w celu wyeliminowania wpływu innych czynników (transparentność, zakresy spektralne światła docierającego do hodowli) oba naczynia hodowlane powinny być wykonane z tego samego materiału – czy tak było w istocie? Czy nie można było przeprowadzić równolegle hodowli dwóch prób w jednakowych naczyniach, ale przy różnej intensywności docierającego światła? Ponadto przy tego typu eksperymentach należy podać pełniejszą charakterystykę światła (jego spektrum, liczbę fotonów docierającą na jednostkę powierzchni w ciągu sekundy) oraz wymienić metody/mierniki wykorzystywane w jego monitorowaniu. Proszę o ustosunkowanie się do tych kwestii.

26. Dlaczego w przypadku *Kamtonema animale* zastosowano wyższe stężenia substratów (1-50 mM) niż dla pozostałych szczepów (1-10 mM)?

27. Dlaczego Doktorantka uznała (str.126), że *Nodularia sphaerocarpa* i *Limnospira maxima* to

szczepy „o niskiej efektywności produkcji alkoholu”? Przeczą temu wyniki badań przesiewowych.

28. W pracy nie znalazłem danych na poparcie wniosku, że *Nodularia sphaerocarpa* „jest niezwykle wydajnym biokatalizatorem, pod względem otrzymywania acetofenonu” Pomimo, że szczep ten wykazywał wysoką aktywność w wytwarzaniu acetofenonu po 24 h, to na podstawie danych w tabeli 39 można zauważyć, że są szczepy o wyższej aktywności.

29. Na podstawie załączonej dokumentacji, trudno zgodzić się ze stwierdzeniem, że „alkohol fenyloetylowy wchodzi w skład systemów regeneracji kofaktorów sinic i służy jako źródło zewnętrznych źródeł protonów i elektronów”. Na tym etapie badań jest to tylko przypuszczenie. W przyszłości, na poparcie tej tezy warto byłoby porównać przebieg reakcji pozakomórkowo z użyciem oksydoreduktaz, z udziałem zredukowanych dinukleotydów NADH i NADPH i bez tych kofaktorów, ale w obecności fenyloetanolu.

30. Nie tylko w przypadku szczepu *Kamptonema animale*, ale także dla innych szczepów widoczny jest spadek stężenia 1-(*R*) fenyloetanolu w czasie trwania biotransformacji (s.106-108).

31. Wśród wymienionych szczepów o najwyższej efektywności w utlenianiu 1-fenyloetanolu do acetofenonu (s. 129) zabrakło najaktywniejszego, *Limnospira indica* (29% konwersji). Z kolei w podsumowaniu nie wymieniono *Synechococcus bigranulatus* jako jednego z najbardziej aktywnych i enancjoselektywnych szczepów w hydrolizie racemicznego octanu 1-fenyloetylu.

32. Na schemacie 13 przedstawiającym biotransformację octanu 1-fenyloetylu powinien być uwzględniony acetofenon jako produkt dalszej przemiany jednego z produktów.

33. Proszę o wyjaśnienie, który z enancjomerów fenyloetanolu jest utleniany preferencyjnie do acetofenonu przez szczepy *Leptolyngbya foveolarum* i *Limnospira maxima*. Chociaż Doktorantka pokazuje na schemacie 14 (i na str. 126), że jest to enancjomer *S*, to nie jest to do końca jasne, ponieważ można dostrzec pewną rozbieżność w interpretacji wyników z badań przesiewowych (s. 106-108) i wyników przedstawianych w dalszej części pracy (Tabele 39, 40, 44). Raz pojawia się spekulacja, że jest to enancjomer (*S*) zaś innym razem, że enancjomer (*R*) (s. 138). Być może jest to uzależnione od stopnia przereagowania substratu, ale dlaczego zatem nie przedstawiono wyników dla biotransformacji przed osiągnięciem 50% konwersji (tabela 40 zawiera wyniki po 1 dobie przy 73% konwersji), to pozwoliłoby na pełniejszą analizę danych. Pokazano te wyniki dopiero w rozdziale 21 dla dwóch szczepów z rodzaju *Nodularia* i szczepu *Limnospira indica*. Wydaje się, że prześledzenie przebiegu biotransformacji każdego z enancjomerów fenyloetanolu osobno, dałoby jeszcze pewniejszą odpowiedź w tej kwestii.

34. W przypadku niektórych szczepów widoczny jest nagły spadek nadmiaru enancjomerycznego 1-*R* fenyloetanolu (w czasie od 3 do 72 h biotransformacji), któremu nie towarzyszy wzrost ilości acetofenonu. Jak można to wytłumaczyć?

35. O ile widoczne są różnice morfologiczne pomiędzy nowymi (2-letnimi) i starszymi (10 letnimi) wersjami szczepów: *Limnospira maxima*, *Leptolybys foveolarum* czy *Nostoc cf-muscorum*, to jednak w przypadku *Synechococcus bigranulatus* (i *Kamptomena animale*) takich różnic nie widać na przedstawionych zdjęciach mikroskopowych. Trudno jednoznacznie stwierdzić, że starsza wersja szczepu *S. bigranulatus* posiada „więcej krótszych i niezagiętych komórek” w porównaniu z wersją nowszą. Dlatego moim zdaniem stwierdzenie, że „różnią się one morfologicznie” nie jest w pełni uzasadnione. Sugeruję w przyszłych badaniach wykonać bardziej precyzyjną analizę zdjęć mikroskopowych i podeprzeć je danymi liczbowymi, np. otrzymanymi poprzez zliczenie liczby poszczególnych form komórkowych w kilku polach widzenia.

36. Z kolei dla potwierdzenia braku „różnic w budowie komórek” *Limnospira maxima* (s. 132) warto byłoby wykonać zdjęcia komórek w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM).

37. Zgodnie z załączoną tabelą 45, stopień przereagowania dla „nowej wersji szczepu” wynosi 99%, a nie jak napisano 72%. W związku z tym, na str. 141 pojawiają się dwa sprzeczne wnioski, dotyczące różnic w szybkości biotransformacji przeprowadzanej przez szczep nowy i szczep pasażowany ponad 10 lat.

38. Nie zgodzę się z Doktorantką, że „stężenia (estru – mt) od 1 mM do 10 mM są obojętne dla biokatalizatora”, gdyż substrat w stężeniu 10 mM powodował spadek przeżywalności komórek *Synechococcus bigranulatus* o 20%. Ponadto na podstawie badań nad przeżywalnością sinic wykonanych tylko jednego szczepu, nie można uogólniać, że „cyjanobakterie są odporne na stosowany ksenobiotyk” (Podsumowanie, s. 171).

39. Dlaczego przeżywalność biokatalizatora określano po 16 godz. biotransformacji (s. 168), a nie na przykład po 24 h czy po 10 h, kiedy monitorowano proces biotransformacji przy użyciu w *S. bigranulatus* w butelce hodowlanej?

40. W pracy znalazłem stosunkowo dużo błędów edytorskich, uproszczeń lub wyrażeń żargonowych.

Nie podobają mi się niektóre sformułowania używane w rozprawie, na przykład:

- (s. 35) w biologii molekularnej nie stosuje się określenia „mutacje nokautowe”, poprawne nazwy to mutacje typu *knock-out* lub mutacje delecyjne;

- (s. 39) bioetanol nie jest „pozyskiwany głównie z drożdży”, jest produkowany przy użyciu drożdży i nie „przez fermentację upraw” a fermentację cukrów roślin uprawnych;

- zamiennie używane są „przeżywalność” i „żywołność” komórek; zwracam uwagę, że to nie są wyrazy znaczeniowo równoważne. Komórki mogą być żywe, ale wykazywać niską żywołność;

- (s.29) w odniesieniu do związków chemicznych zaangażowanych w szlaki metaboliczne, niespotykana jest w literaturze polskiej nazwa „prekursor biogenetyczny”; w tym przypadku bardziej odpowiednim określeniem jest „prekursor biogeniczny”;

- (s. 44) jest „zbadano światło” powinno być ‘zbadano wpływ światła’
- (s. 91) „hodowle na świetlówkach”
- (s. 66) poprawnym określeniem w opisywanym przypadku jest sterylizacja lub jałowienie w autoklawie a nie „utylicacja”
- (s. 24) „inhibicja substratu lub produktu” chodziło zapewne o inhibicję enzymów/biokatalizatora;
- podpisy pod rysunkami i opisy tabel są czasami zbyt lakoniczne, np. podpisy pod chromatogramami (s. 98, 103) powinny zawierać inną treść: jest „wzór substratu”, powinno być chromatogram wzorca substratu albo chromatogram przedstawiający stabilność substratu; z kolei opisy tabel 10-16 są nieprecyzyjne;
- w *Streszczeniu* powinno być doprecyzowane co oznacza „nowa wersja szczepu” (s.10);
- „ilość właściwości” (s.18);
- (s. 26) brak nazwy wielkości fizycznej dla podanej wartości i jednostki;
- (s.41) brak słowa ‘wody’
- (s. 45) jest „...wyprodukował do 29,6 mg/g astaksantyny (masa suchych komórek)”, powinno być wyprodukował astaksantynę z wydajnością 29,6 mg/g suchej masy komórek;
- (s. 62) powinno być dodane, że roztwór sterylizowano przez filtry bakteriologiczne;
- zakupiono kultury hodowlane, a nie *zakupiono kultury*;
- w pracy pojawiają się niezdefiniowane skróty nazw (np. TCA, PHA, SPL1). Doktorantka mogła zamieścić wykaz stosowanych skrótów;
- (s. 70) jest „przepływ kolumny” powinno być przepływ przez kolumnę;
- (s. 126) jest „konwersji acetofenonu”, czy nie powinno być *konwersji fenyloetanolu do acetofenou?*
- błąd w numeracji tabeli (s.129);
- (s. 135) przy „medium hodowlanym” należało dodać symbol SM;
- (Tab. 46) czy drastyczny spadek *ee* 1-(*R*) fenyloetanolu z 63 na 3 to nie pomyłka?
- (s. 141) barak precyzyjnego określenia co dokładnie oznacza zastosowanie cyjanobakterii w procesach „w dużej skali”. „Powiększenie skali procesu” stosuje się częściej w kontekście zwiększania rozmiarów/objętości naczyń hodowlanych i (bio)reaktorów, a nie „na drodze zwiększania stężenia substratu”
- (s. 146) „niezwiązane z filamentami (trychomami) heterocysty” *Nostoc cf-muscorum* nie są przedstawione na rysunku 20.
- (s. 149) określenie „optymalizacja procesu biotransformacji” w kontekście przeprowadzonych doświadczeń jest pewnym nadużyciem; zapewne Doktorantce chodziło o optymalizację czasu biokonwersji;
- maksimum przy $\lambda = 524$ nm widoczne jest na widmie emisji, a nie na widmie wzbudzenia (s. 165)

41. Natknąłem się także na kilka błędów stylistycznych i interpunkcyjnych (np. str. 23, 42, 44, 46, 77, 85, 93, 109, 115, 124, 131, 162) oraz literówek (str. 42, 44, 45, 61 65, 73, 85, 132, 134, 162, 163).

Powyższe uwagi mają charakter dyskusyjny i nie pomniejszają znacząco wartości poznawczej pracy. Mimo pewnych nieścisłości oraz krytycznych uwag, które wskazałem z obowiązku Recenzenta, uważam, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr inż. Agnieszkę Śliżewską prezentuje dobry poziom merytoryczny i naukowy, a jakość i dobór zastosowanych metod badawczych nie budzi większych zastrzeżeń. Doktorantka sprawnie posługuje się technikami chromatograficznymi, spektrofotometrycznymi i mikroskopowymi, jako narzędziami niezbędnymi do analizy wydajności reakcji biotransformacji i aktywności biokatalitycznej testowanych szczepów cyjanobakterii. Wykazała się rozległą znajomością piśmiennictwa, które jest prawidłowo i w dostatecznym stopniu wykorzystane. W mojej opinii, przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki świadczą o tym, że Doktorantka starała się wykonać swoje badania jak najbardziej kompleksowo i z dużym zaangażowaniem.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa pod względem poznawczym i aplikacyjnym, generalnie została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana. W wyniku realizacji badań została rozszerzona wiedza w przedmiocie aktywności katalitycznej sinic wobec ksenobiotycznych substratów. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że część otrzymanych wyników została opublikowana w dwóch bardzo dobrych czasopismach z listy JCR, oraz w ogólnodostępnym naukowym serwisie internetowym SSRN, a Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch z nich. O wysokiej wartości aplikacyjnej wyników pracy doktorskiej Pani mgr Śliżewskiej świadczy także duża liczba otrzymanych patentów. Jak można sądzić po wykazie autorów, Doktorantka miała znaczący udział w ich opracowaniu.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona przez mgr inż. Agnieszkę Śliżewską rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.), stanowiąc znaczny wkład w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne. W związku z tym wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Śliżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

