

Łódź, dn. 07.09.2022 r.

Dr hab. inż. Aneta Białkowska, prof. uczelni  
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka  
ul. Stefanowskiego 2/22, 90-537 Łódź  
[aneta.bialkowska@p.lodz.pl](mailto:aneta.bialkowska@p.lodz.pl)

## Recenzja

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

### Podstawa formalna

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej z 13 lipca 2022 roku.

Przedmiotem recenzji jest szczegółowa ocena pracy i odpowiedź na pytanie, czy rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Śliżewskiej spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.). Wymogiem art. 13 Ustawy jest, by rozprawa doktorska przygotowana pod opieką promotora, stanowiła **oryginalne rozwiązanie problemu naukowego** lub oryginalne dokonanie artystyczne oraz **wykazała ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki/kandydata w danej dyscyplinie naukowej** lub artystycznej, a także **umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej** lub artystycznej. W związku z tym, recenzja została napisana z uwzględnieniem wskazanych powyżej wymogów Ustawy.

### Wybór i znaczenie tematu

Podjęta w pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Śliżewskiej problematyka badawcza dotycząca zbadania potencjału katalitycznego sinic, zwłaszcza w kierunku przekształcenia trzech wybranych, modelowych substratów, tj. octanu 1-feniloetylu, epoksystyrenu oraz styrenu, jest niezwykle ciekawa i ma potencjalnie istotne znaczenie praktycznie. W ostatnich latach coraz częściej w literaturze naukowej dyskutuje się o przewodze cyjanobakterii nad innymi mikroorganizmami, takimi jak bakterie właściwe czy drożdże w różnych procesach biotechnologicznych. Unikatowe cechy sinic do których należą: stosunkowo szybki przyrost

biomasy przy odpowiednim dostępie do dwutlenku węgla, wody i energii; minimalne wymagania pokarmowe; „elastyczność” metabolizmu i możliwość szybkiej adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych, nawet tych ekstremalnych, spowodowały, że organizmy te z powodzeniem rozpatrywane są jako źródło interesujących metabolitów o dużych walorach aplikacyjnych. Dotychczas najczęściej uwagi poświęca się metabolitom wtórnym o aktywności biologicznej, które są produktami wyspecjalizowanego metabolizmu sinic, charakteryzują się bardzo zróżnicowaną budową chemiczną, ponadto cechuje je często duża specyficzność i wybiórczość w oddziaływaniu na inne organizmy. Pierwsze intensywne badania nad cyjanobakteriami pod kątem poszukiwania nowych związków biologicznie czynnych rozpoczęto ponad 30 lat temu. Dziś wykorzystuje się te mikroorganizmy jako źródło związków wykazujących korzystną dla człowieka aktywność biologiczną, w tym np. aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwwirusową, przeciwnowotworową, czy fotoprotekcyjną. Stanowią zatem cenne narzędzie do zastosowań w medycynie, farmacji, biotechnologii, a także w różnych gałęziach przemysłu kosmetycznego, spożywczego, tekstylnego i morskiego. Nie należy jednak zapominać, że niektóre metabolity wtórne są toksynami i mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia oraz życia człowieka.

Badania, opublikowane w ostatnich latach pokazują, że sinice to także źródło biokatalizatorów, wykorzystywanych w różnych biotransformacjach, zarówno związków naturalnych, jak i połączeń syntetycznych. Większość z tych przemian, w obecności komórek cyjanobakterii zachodzi z wysoką stereospecyficznością, umożliwiając tym samym syntezę związków chiralnych, które stanowią półprodukty w syntezie wysokowartościowych chemikaliów, w szczególności farmaceutyków. A zatem wykorzystywanie fotoautotroficznych bakterii, jako źródła interesujących z biotechnologicznego punktu widzenia katalizatorów biologicznych, może znacznie poszerzyć możliwości biokatalizy i zwiększyć pulę dostępnych związków chiralnych, które trudno jest syntetyzować tradycyjnymi metodami chemicznymi. Co więcej, właściwie opracowana strategia biokonwersji danego związku oparta o aparat enzymatyczny sinic w wielu przypadkach staje się wysoce konkurencyjna dla homologicznego procesu z wykorzystaniem niefotosyntetyzujących i heterotroficznych mikroorganizmów lub wyizolowanych z nich enzymów. Warto jednak podkreślić, że cyjanobakterie są nadal stosunkowo rzadko stosowane w biokatalizie, choć liczba klasyfikowanych gatunków sinic rośnie w dużym tempie z roku na rok. Jednym z ważnych powodów jest wysoka zmienność morfologiczna tych mikroorganizmów, którą nabywają w trakcie hodowli, poza ich naturalnym środowiskiem bytowania, czyli w warunkach laboratoryjnych. Ta cecha biokatalizatora, rozumianego jako cała komórka, nie zapewnia zatem powtarzalności procesu. Istotnych problemów można również dopatrywać się we właściwym doborze systemów i warunków hodowli sinic, zapewniających optymalny i zrównoważony wzrost fotobiokatalizatora. Co więcej, wciąż brakuje dogłębnej wiedzy na temat stereochemicznej kontroli katalizowanych reakcji.

W związku z przedstawionymi faktami uważam, że dokonany przez Doktorantkę wybór tematu badawczego jest bardzo trafny i wnoszący wiele elementów nowości, szczególnie też ze względu na wysoce zróżnicowany i mało dotychczas poznany w literaturze temat obiekt badań, tj. osiem szczepów cyjanobakterii należących do różnych rodzajów i gatunków. W pełni uzasadniona jest realizacja celów postawionych przez Panią mgr inż. Agnieszkę Śliżewską w recenzowanej pracy. Już na tym etapie analizy rozprawy doktorskiej należy wyróżnić i docenić odważny i duży zakres realizowanych prac związany z doбором optymalnych warunków hodowli wytypowanych do badań sinic, z selekcją najbardziej wydajnych

fotobiokatalizatorów w pożądanym biotransformacjach; z dogłębną walidacją metody analitycznej, z oceną wpływu zmian morfologicznych cyjanobakterii na ich zdolności katalityczne oraz z optymalizacją warunków przekształcenia racemicznego octanu 1-fenyloetylu (sposób naświetlania hodowli, czas trwania biokonwersji, stężenie substratu, także w kontekście przeżywalności komórek) pod kątem oceny stopnia konwersji substratu, nadmiaru enancjomerycznego produktu/ów oraz enancjoselektywności reakcji.

### **Ocena pracy pod względem wymagań formalnych**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Śliżewskiej ma klasyczną dla tego rodzaju dokumentów strukturę i liczy 198 stron. Składa się z pięciu głównych rozdziałów (wprowadzenie, cel badań, materiały i metody, część eksperymentalna i podsumowanie), wzbogaconych streszczeniem w języku polskim i zestawieniem dorobku naukowego autorki. Istotnym elementem pracy jest bibliografia, zawierająca 222 pozycje literaturowe, ponumerowane zgodnie z cytacjami w tekście, umieszczone na 13 stronach tekstu. W pracy znajduje się ponadto 71 rysunków, 57 tabel oraz 14 schematów, a ich spisy autorka umieściła na końcu pracy, tuż przed bibliografią.

Warto podkreślić, że w rozdziale „Podsumowanie” doktorantka zrekapitulowała rezultaty swojej pracy oraz we właściwy sposób uargumentowała potwierdzenie hipotez badawczych. Dobrą praktyką jest zamieszczanie w pracy doktorskiej dyskusji wyników, której w niej zabrakło. Myślę, że wartościowa byłaby interpretacja wyników badań Doktorantki i ich konfrontacja z wynikami innych autorów literatury światowej z danego zakresu badawczego. Zdaję sobie jednak sprawę, że nie jest to łatwe, zwłaszcza w przypadku innowacyjnych badań.

Tytuł pracy jest zwięzły, może nawet zbyt prosty, bo nie oddający złożoności doświadczeń i analiz przeprowadzonych przez Autorkę. Od strony edytorskiej praca jest dobrze przygotowana. Pojawiają się co prawda niefortunne sformułowania i błędy literowe, ale one nie zakłócają odbioru pracy i nie wpływają na wartość naukową rozprawy.

Stwierdzam, że praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim.

### **Ocena pracy pod względem wymagań merytorycznych**

W streszczeniu rozprawy Pani mgr inż. Agnieszka Śliżewska przedstawiła informacje o przeprowadzonych doświadczeniach i uzyskanych wynikach. Lektura tej części wskazuje na szeroki zakres wykonanych prac, a po jej przeczytaniu zwiększa się zainteresowanie dalszymi rozdziałami rozprawy.

Kolejny rozdział zatytułowany „Wprowadzenie” liczy 31 stron. Doktorantka dokonała w nim przeglądu literatury dotyczącej zagadnień związanych z Jej tematyką badawczą. Wydzieliła w nim trzy zasadnicze podrozdziały, w pierwszym dokonała charakterystyki cyjanobakterii pod kątem różnych właściwości i podkreśliła potencjał biotechnologiczny tych mikroorganizmów, szczególnie w kierunku produkcji istotnych z aplikacyjnego punktu widzenia związków biologicznie aktywnych; w kolejnym właściwie uargumentowała przewagę biokatalizy nad syntezą chemiczną, głównie w kontekście stosowania komórek sinic jako biokatalizatorów transformacji, szczególnie tych opartych o redukcję aldehydów i ketonów. W tym podrozdziale Autorka wskazała także możliwości zwiększania wydajności i konkurencyjności katalizowanych przez cyjanobakterie reakcji z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej. W mojej ocenie tytuł tego podrozdziału, tj. „Reakcje biokatalizy –

elastyczność metaboliczna sinic” nie jest do końca trafny i nie odzwierciedla w pełni zawartych w nim informacji. Można by po nim oczekiwać dogłębnej analizy zmian, jakie mogą zachodzić w transkryptomie lub metabolomie cyjanobakterii, zwłaszcza w warunkach stresu środowiskowego. Doktorantka skupia się jednak głównie na zmianach metabolizmu na skutek heterologicznej ekspresji genu/ów oraz wprowadzaniu mutacji w komórkach sinic. Takie działania są ingerencją zewnętrzną w materiał genetyczny gospodarza i trudno tutaj mówić o elastyczności, czy plastyczności metabolizmu. Ponadto, w kontekście tematu rozprawy doktorskiej, część tego podrozdziału dotycząca wykorzystania cyjanobakterii w konkretnych, opisanych już w literaturze biotransformacjach powinna zostać wydzielona. Niefortunne jest także częste stosowanie zwrotu „całe komórki biokatalizatora”, wystarczyłoby używać komórki biokatalizatora. Ponadto na str. 23. Autorka pisze „...sinice stanowią cenne źródło enzymów, odpowiednich do katalizowania trudnych reakcji...”, bardzo proszę o wyjaśnienie co w tym kontekście oznacza słowo „trudne”. W tym samym podrozdziale na str. 28 w pierwszym akapicie tekstu znajduje się bardzo zdawkowa informacja dotycząca redukcji wiązań C=C w obecności katalizatorów biologicznych, uprzejmie proszę o przedyskutowanie tej kwestii w kontekście cyjanobakterii. Interesująca z technologicznego punktu widzenia jest informacja podana przez Doktorantkę dotycząca zdolności zmodyfikowanych genetycznie sinic *Synechococcus elongatus* PCC 7942 do produkcji 1,3-propanodiolu, zabrakło w niej jednak informacji o ilości diolu produkowanego przez rekombinowane komórki. Podobny niedosyt informacji dotyczy rekombinacji molekularnych, jakich dokonano w celu otrzymania halotolerancyjnych szczepów sinic (fragment ze strony 35). Ostatni podrozdział Wprowadzenia pt. „Inne zastosowania cyjanobakterii” Doktorantka poświęciła wykazaniu roli sinic w rozwoju zrównoważonej energii i produkcji związków o wartości dodanej, takich jak 2,3-butanodiol, astaksantyna, czy polihydroksymaślan. Słusznie wskazała, że biomasa sinic to kluczowy materiał biopaliwowy trzeciej i czwartej generacji, choć aby technologia produkcji bioenergii z ich udziałem stała się konkurencyjna potrzeba jeszcze rozwiązania wielu problemów. Jako jeden z nich doktorantka podaje obecność produktów ubocznych w komórkach cyjanobakterii (str. 42), ograniczających ich wykorzystanie w tym zakresie. Uprzejmie proszę o doprecyzowanie tej myśli.

Do przygotowania części teoretycznej pracy Doktorantka wykorzystwała bogatą literaturę źródłową. Opracowanie to, napisane poprawnym językiem, szeroko ujmuje przedmiotową problematykę badawczą i potwierdza bardzo dobre przygotowanie do podjętego zadania. Za dużą wartość dodaną tej części pracy uważam utrzymanie właściwego balansu pomiędzy wskazywanymi zaletami wykorzystania sinic w biotechnologii, a ograniczeniami i wyzwaniem, jakie stoją przed naukowcami, aby w pełni wykorzystać potencjał tych prokariotycznych, fotosyntetyzujących bakterii.

Należy jednak nadmienić, że w tekście „Wprowadzenia” pojawia się kilka niezręcznych lub dyskusyjnych sformułowań, np. „biokataliza całokomórkowa”, „antybiotykooporność”, „reakcje przeprowadzone całymi komórkami”, „fotosyntezujące sinice”, „zsyntetyzowano sześcioma szczepami sinic”, „reduktaza enanowa”, „amina-liaza tyrozynowa”, „ekspresja genów do szczepów”, „szlak 4-fosforometyloerytrytolu”. Oczywiście zdaję sobie sprawę, że dla części z nich można byłoby prowadzić ożywioną dyskusję, czy są one do przyjęcia, czy też powinniśmy ich unikać.

Podsumowując tę część pracy, należy stwierdzić, że Pani mgr inż. Agnieszka Śliżewska posiada zaawansowaną wiedzę z zakresu tematyki ocenianej pracy doktorskiej.

W kolejnym rozdziale został przedstawiony prawidłowo sformułowany cel pracy, jest on bardzo interesujący, ambitny i aktualny oraz znakomicie wpisuje się w lukę badawczą dotyczącą tej grupy mikroorganizmów. Oprócz celu głównego Doktorantka prawidłowo zidentyfikowała sześć celów szczegółowych, które korespondują z celem głównym i których osiągnięcie gwarantuje jednocześnie osiągnięcie celu głównego. W tej części Autorka zaproponowała osiem tez badawczych, które nawiązują do głównego celu pracy. W mojej opinii są to raczej hipotezy badawcze. Doktorantka poprzez wykonane badania i uzyskane wyniki sprawdza ich prawdziwość, czyli dokonuje weryfikacji założonych hipotez. Można by się także zastanowić, czy dla przyjętej koncepcji pracy, nie lepiej byłoby sformułować główną hipotezę badawczą i dobrze korespondujące z nią hipotezy szczegółowe.

Rozdział 4 pracy pt. „Materiały i metody” zawiera szczegółowe informacje na temat licznych, stosowanych przez Doktorantkę metod badawczych i analitycznych a poprzedzony jest zestawieniem stosowanych odczynników chemicznych oraz listą wykorzystywanych cyjanobakterii i opisem podłoży mikrobiologicznych stosowanych do ich hodowli. Autorka wytypowała konkretne podłoża dla każdego ze szczepów, zrobiła to, jak można się domyślać, na podstawie przeglądu literatury. Wskazane byłoby zatem dodanie do tabeli 6. odnośników literaturowych. Moim zdaniem Doktorantka nie zawsze najlepiej pogrupowała i ponumerowała podrozdziały w tej części pracy dysertacyjnej. Wysoko należy ocenić fragment tego rozdziału dotyczący dokładnego opisu walidacji metody analitycznej opartej o chromatografię gazową. Doktorantka właściwie zweryfikowała wiele parametrów wpływających na wiarygodność uzyskanych przez nią wyników.

Pytania i sugestie dotyczące tej części pracy przedstawiłam w punktach i tak:

1. Zasadne byłoby podanie w punkcie 7.1. warunków namnażania inokulum, wykorzystywanego do zaszczepienia właściwych hodowli cyjanobakterii
2. W punkcie 8.1 istotne byłoby podanie objętości/stężenia biokatalizatora stosowanego w biotransformacjach. Czy było ono stałe, a zmienne były tylko stężenia substratu?
3. W punkcie 8.2.1. pt. „Stabilność substratu w podłożu hodowlanym” w ostatnim zdaniu Doktorantka pisze o procesie zakończenia **biotransformacji**. Czy zasadne jest w tym przypadku stosowanie takiej terminologii, w przyjętym eksperymencie nie było biokatalizatora.

Rezultaty przeprowadzonych badań zostały wnikliwie omówione w kolejnym, liczącym 83 strony rozdziale zatytułowanym „Część eksperymentalna”. Realizację swoich badań Doktorantka rozpoczęła od wyznaczenia krzywych wzrostu dla badanych szczepów sinic, obrazujących zależności zmiany wartości logarytmu dziesiętnego liczby komórek w czasie. Udowodniła, że krzywe wzrostu nowych szczepów, zakupionych z Czeskiej Kolekcji Kultur Autotroficznych, pokrywają się z tymi uzyskanymi dla homologów pasażowanych na przestrzeni 10 lat. Doktorantka wyjaśnia, że ten etap badań wykonała, aby dokonać właściwego doboru biokatalizatora. Uprzejmie proszę o wyjaśnienie tego stwierdzenia, zwłaszcza, że mimo różnic w krzywych wzrostu badanych sinic Autorka pracy w reakcjach biotransformacji w każdym przypadku jako biokatalizator stosowała 21-dniową ciecz po hodowli cyjanobakterii. Za ważne i warte podkreślenia uważam skonstruowanie przez Panią mgr inż. Śliżewską komory do hodowli sinic, która zapewnia odpowiednią temperaturę oraz oświetlenie dla efektywnego przyrostu biomasy. Był to jeden z celów szczegółowych, który w mojej opinii został w pełni

zrealizowany. W toku dalszych badań Doktorantka skupiła się na ocenie zdolności enzymatycznych cyjanobakterii w reakcjach redukcji styrenu i hydrolizy epoksystyrenu oraz octanu 1-feniloetylu. W pierwszej kolejności sprawdziła stabilności substratów w różnych podłożach hodowlanych dedykowanych różniącym się taksonomicznie mikroorganizmom z wykorzystaniem chromatografii gazowej. Było to racjonalne posunięcie i pozwoliło wykluczyć biotransformacje, w których jeden z ważniejszych komponentów reakcji – substrat ulegał niekorzystnym przemianom. Doktorantka, na podstawie zamieszczonych chromatogramów udowodniła, że zarówno styren, jak i epoksystyren nie są stabilne w zadanych warunkach, a ich zastosowanie w reakcjach katalizowanych przez sinice nie daje oczekiwanych produktów. Bardzo proszę jednak o wyjaśnienie, dlaczego dla styrenu oznaczenia w próbach kontrolnych i właściwych wykonywano po 48 godz. biotransformacji, a dla epoksystyrenu po 72 godz. Dodatkowo, za niefortunne uważam stosowanie bardzo lakonicznych tytułów niektórych podrozdziałów, np. „Próby kontrolne”, czy „Próby właściwe”. Interesujące wyniki Doktorantka otrzymała w biokonwersji racemicznego substratu - octanu 1-feniloetylu. Po pierwsze, wykazała stabilność tego substratu w podłożach B11, B11<sub>0</sub> i nieco mniejszą w podłożu SM (tutaj pojawiały się dodatkowe, ale zidentyfikowane piki), po drugie potwierdziła zdolności enzymatyczne siedmiu szczepów sinic w kierunku hydrolizy 1 mM racemicznego octanu 1-feniloetylu, a po trzecie udowodniła enancjoselektywny charakter tej przemiany, prowadzącej do otrzymywania czystego enancjomeru 1-(*R*)-fenyloetanolu i czystego enancjomeru nieprzereagowanego substratu octanu 1-(*S*)-fenyloetylu. Dla różnych czasów biotransformacji wyznaczyła stopień konwersji, nadmiary enancjomeryczne produktów oraz współczynnik enancjoselektywności. Na podstawie tych badań Doktorantka potwierdziła, że bardzo istotnym parametrem decydującym o efektywności i enancjoselektywności reakcji katalizowanej przez komórki cyjanobakterii jest czas trwania danej biotransformacji. Z czystej ciekawości chciałabym zapytać, dlaczego w tych badaniach nie uwzględniono szczepu *Nodularia moravica* CCALA 797. Wnikliwa analiza wspomnianych parametrów dokonana przez Doktorantkę doprowadziła ją do kolejnych bardzo interesujących hipotez. Na podstawie analizy instrumentalnej potwierdziła je, wykazując, że badane fotobiokatalizatory są zdolne do enancjoselektywnego utleniania jednego z produktów reakcji 1-feniloetanolu do acetofenonu. Jak słusznie zauważa Doktorantka wydajność tej reakcji zależy od rodzaju biokatalizatora i czasu trwania biotransformacji. Tego rodzaju uzdolnienia enzymatyczne są widoczne szczególnie w przypadku szczepów cyjanobakterii z rodzaju *Nodularia* i *Limnospira*. Autorka rozprawy stwierdza, w mojej opinii słusznie, że dla tych szczepów alkohol fenyloetylowy wchodzi w skład systemów regeneracji kofaktorów sinic i służy jako źródło zewnętrznych protonów i elektronów. Jako recenzent mogłabym jedynie odpowiedzieć Doktorantce, aby w takich przypadkach raczej stosować tryb przypuszczający, czyli „mogą wchodzić” lub „może służyć”. Nie mamy bezpośrednich dowodów, chociażby z poziomu metabolomu komórki, że tak właśnie jest. Na str. 130 Pani mgr inż. Śliżewska postuluje możliwość takiego zaprojektowania reakcji hydrolizy racemicznego octanu 1-feniloetylu z wykorzystaniem komórek cyjanobakterii, aby możliwe było otrzymywanie czystego enancjomeru 1-(*R*)-fenyloetanolu oraz acetofenonu. Uprzejmie proszę o wskazanie mocnych i słabych stron takiego rozwiązania.

W kolejnym etapie badań Doktorantka wykazała, że morfologia cyjanobakterii wpływa na wydajność i enancjoselektywność reakcji hydrolizy racemicznego octanu 1-feniloetylu. W badaniach tych wykorzystywała identyczne taksonomicznie szczepy sinic pasażowane od ponad 2 i 10 lat w macierzystej uczelni. Dokonując obserwacji mikroskopowych tych

mikroorganizmów potwierdziła ich zmienność morfologiczną, skupiając się przy tym głównie na budowie (liniowej lub spiralnej) trychomów. Badania te uważam za bardzo istotne, jak dotąd bowiem, silną korelację pomiędzy zmianami adaptacyjnymi a budową trychomów opisano jedynie dla sinic z rodzaju *Spirullina*. Uzyskane przez Autorkę wyniki z tego zakresu prowadzą do ciekawych wniosków, potwierdzających silną korelację pomiędzy morfologią komórki a bioróżnorodnością jej proteomu. Doktorantka zaobserwowała, że budowa trychomów ma wpływ na aktywność enzymatyczną fotobiokatalizatora, nie udało się jednak znaleźć ogólnej prawidłowości, zależność ta wyglądała różnie dla każdego z badanych szczepów cyjanobakterii. Zebrane wyniki Doktorantka umieściła w rozdziale 20. Moim zdaniem nie zawsze właściwie go pogrupowała w podrozdziały i zatytułowała, w tym np. dla szczepu *Synechococcus bigranulatus* CCALA 187 Autorka wyodrębnia podrozdział „Biotransformacje” (20.3.1), a dla dwóch pierwszych już nie (20.1. i 20.2.). Tytuły stanowią nazwy szczepów i nie wprowadzają czytelnika w zakres prowadzonych badań. Za niefortunne uważam również podpisy tabel, przedstawiające wybrane parametry biotransformacji (41-46; 48-49; 51-52; 54-56). Uprzejmie proszę o zasugerowanie odpowiedniejszego zapisu, chociażby dla jednej, wybranej biotransformacji.

Interesujące i wartościowe są wyniki dotyczące wpływu sposobu naświetlania hodowli na szybkość i efektywność procesu biotransformacji. Badania te Doktorantka przeprowadziła przy różnych stężeniach substratu, prowadząc hodowle sinic w kolbach Erlenmeyera i płaskich butelkach hodowlanych. Szczególnie cenne wyniki uzyskała dla szczepu *Nostoc cf-muscorum*, dla którego po zwiększeniu ekspozycji na światło, jednym z produktów reakcji hydrolizy racemicznego octanu 1-feniloetylu był czysty alkohol 1-(R)- feniloetanol. Dla 4 mM stężenia substratu enancjoselektywność tej reakcji wynosiła 275. Istotnym, w mojej opinii utrudnieniem, w porównywaniu i interpretacji wyników są różne, dla kilku badanych szczepów, czasy biotransformacji. Ponadto, niejasne jest wydzielenie przez Doktorantkę podrozdziału 21 pt. „Indywidualny dobór warunków biotransformacji racemicznego octanu 1-feniloetylu dla wytypowanych fotobiokatalizatorów o najlepszej aktywności”. Czy nie jest to po części powtórzenie wyników zawartych we wcześniejszym rozdziale (rozd. 16.3.2.; tabele 12-14), niewątpliwie nowość w tym rozdziale stanowią parametry procesu katalizowanego przez *Nodularia moravica*.

Ostatnia część tego rozdziału pracy dotyczy badania stabilności (przeżywalności) fotobiokatalizatora *Synechococcus bigranulatus* CCALA 187\* w obecności różnych stężeń substratu - racemicznego octanu 1-feniloetylu, za pomocą cytometrii przepływowej. Zastosowana przez Doktorantkę procedura barwienia pozwoliła na zróżnicowanie komórek żywych i martwych po procesie biotransformacji. Rezultaty tych doświadczeń wskazują na szeroki zakres stabilności badanego biokatalizatora w środowisku ksenobiotycznego substratu – octanu 1-feniloetylu, co jest bardzo istotne, jak słusznie zauważa Doktorantka, dla zwiększania skali procesu czy wykorzystania cyjanobakterii w procesach ciągłych. Rozważałabym jednak przeprowadzenie tego rodzaju badań w pierwszej kolejności, można bowiem stwierdzić, że zaprojektowane przez Autorkę warunki biotransformacji dla 50 mM stężenia substratu nie były zasadne.

W kilku miejscach w tej części rozprawy znajdują się drobne pomyłki i niejasne sformułowania, np.

- na stronie 141 pojawia się nieprawidłowe odniesienie do tabel („w tabelach 46-46”),
- na stronie 141 pojawia się błędne sformułowanie „Powyżej trzech godzin trwania procesu, można zauważyć, że po 7 godzinach trwania procesu...”
- na stronie 144 Doktorantka stosuje nieprecyzyjny zapis, w którym pisze o „różnicach w stopniach konwersji pomiędzy butelką, a kolbą Erlenmeyera”, podobnie na stronie 156 pojawia się informacja o wielkości powierzchni, która pada na hodowlę.

Podsumowując część eksperymentalną pracy stwierdzam, że zakres wykonywanych badań był ambitny i szeroki. Uzyskane w trakcie ich realizacji wyniki potwierdzają, że Doktorantka zrealizowała postawione na wstępie cele. Wyniki Jej badań są bardzo cenne i stanowią ważne uzupełnienie zgromadzonej dotychczas wiedzy na temat uzdolnień enzymatycznych cyjanobakterii i ich wykorzystania w zrównoważonej biotechnologii.

W ostatnim etapie rozprawy, przytaczając i interpretując konkretne badania, Doktorantka dokonała podsumowania uzyskanych wyników i zweryfikowała hipotezy badawcze.

Rozprawa jest podstawą do dyskusji naukowej, a pytania przedstawione poniżej wynikają z czystej ciekawości recenzenta:

1. Czy znane są inne, niż te stosowane przez Doktorantkę metody przechowywania sinic, zwiększające być może ich stabilność morfologiczną?
2. Czy w opinii Doktorantki, dla podniesienia efektywności biotransformacji, zasadne byłoby zoptymalizować stężenie/ilość biokatalizatora (rozumianego jako komórka)?
3. Czy Doktorantka sprawdzała jak na wydajność analizowanych biotransformacji wpływa czas hodowli fotobiokatalizatora? W pracy przyjęto, że enzymy wykorzystywane w docelowych biotransformacjach są metabolitami wtórnymi i najefektywniej produkowane są w fazie stacjonarnej wzrostu gospodarza. Czy zostało to potwierdzone we wcześniejszych badaniach?
4. Literatura\* podaje, że szczep *Leptolyngbya foveolarum* wykazuje wzrost w postaci biomasy, która osiada na dnie, co może dodatkowo wpływać na ograniczony kontakt substratu z komórkami sinic w warunkach stacjonarnych. Jak Autorka poradziła sobie z tym problemem w swoich badaniach?

Podsumowując, uważam, że mgr inż. Agnieszka Śliżewska podjęła bardzo ciekawy temat, wykazując się jednocześnie odpowiednim warsztatem badawczym oraz szeroką znajomością tematu. Swoją rolę jako recenzenta nie postrzegam wyłącznie w kontekście wskazania ewentualnych nieprawidłowości i dokonania całościowej oceny rozprawy jedynie przez pryzmat popełnionych błędów. W mojej ocenie, zadaniem recenzenta powinno być przede wszystkim wskazanie tych aspektów, których dopracowanie mogłoby wspomóc dalszy rozwój naukowy Doktorantki. Wszelkie uwagi, komentarze wskazane przeze mnie w recenzji nie stanowią w swej istocie zarzutów o poważnym charakterze merytorycznym, a mają przede wszystkim zachęcić do dyskusji i dalszej wymiany spostrzeżeń.

\*Górak M., Żymańczyk-Duda E. (2014) Zastosowanie cyjanobakterii w biotransformacji 2-oksopropanofosfonianu dietylu”, CHEMIK 68.2, 123-128



## **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Śliżewskiej pt „ Ocena właściwości katalitycznych sinic” spełnia wymagania stawiane przez art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.), jest bowiem samodzielny i bardzo wartościowym dorobkiem naukowym, wnosi do nauki wiele elementów poznawczych i ma znaczenie dla praktyki. W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Śliżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki są oryginalne, wartościowe pod względem poznawczym oraz potencjalnie aplikacyjnym uważam, że całość rozprawy zasługuje na wyróżnienie, o które wnioskuję do Wysokiej Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Wrocławskiej.**

Aneta Białkowska

