

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

Gliwice, 25.08.2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Małgorzaty Cieńskiej
pt. „Biotransformacje związków fenolowych z wykorzystaniem tyrozynazy z
Agaricus bisporus w formie natywnej i immobilizowanej”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Bryjak, dotyczy badań nad wykorzystaniem tyrozynazy z *Agaricus bisporus* w formie natywnej i immobilizowanej, w procesach biotransformacji szerokiej gamy fenoli do produktów użytecznych w różnych gałęziach przemysłu. Szczególny nacisk położono na związki mające zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym (L-DOPA, 3-hydroksytyrozol czy kwas cynobrowy).

Rosnące zainteresowanie procesami biotransformacji można zaobserwować nie tylko w zakresie badań laboratoryjnych, ale także w różnych gałęziach przemysłu. Jest to szczególnie widoczne w dobie realizacji strategii zrównoważonego rozwoju. Enzymy, ze względu na swoje właściwości, posiadają ogromny potencjał aplikacyjny jako biokatalizatory. W wielu przypadkach problemem jest jednak stosunkowo wysoka cena ich izolacji i oczyszczania, jak również mała stabilność i brak możliwości zwracania do kolejnych procesów. Często występuje również zjawisko inhibicji substratowej lub produktowej enzymu, które uniemożliwia uzyskanie odpowiednich wydajności produktów z jednostki objętości reaktora. W tym świetle podjęte przez Doktorantkę badania nad opracowaniem warunków procesu biotransformacji z udziałem natywnej, a przede wszystkim immobilizowanej tyrozynazy są jak najbardziej aktualne i uzasadnione.

Na początku pracy, w streszczeniu, Autorka opisała krótko tyrozynazę oraz zakres badawczy. Rozdział „Wstęp literaturowy” (27 stron) rozpoczyna natomiast ogólne wprowadzenie na temat zasadności prowadzenia procesów chemicznych zgodnie ze strategią zrównoważonego rozwoju. Doktorantka podkreśliła udział i znaczenie biotransformacji oraz biokatalizy. Następnie przedstawiła ogólnie typy białek miedziozależnych, opisała tyrozynazę, jej funkcje w różnych organizmach oraz strukturę. Szkoda, że Autorka nie pokusiła się o przedstawienie struktury enzymu i centrum aktywnego (np. na podstawie publikacji Ismaya W., 2011; PDB 2y9w), co znacznie ułatwiłoby śledzenie dyskusji na temat poszczególnych podjednostek i budowy centrum aktywnego, tym bardziej, że w dalszej części pracy dyskutowane jest zachowanie poszczególnych atomów miedzi (A i B) w procesie utleniania mono- i difenoli. W kolejnym podrozdziale dokładnie przedyskutowane zostały, opisane w literaturze, różne podejścia do mechanizmu reakcji katalizowanych przez tyrozynazę. Z technologicznego punktu widzenia, istotnym

fragmentem jest omówienie zjawiska dezaktywacji enzymu oraz jego przyczyny. Doktorantka wskazała również metody pozwalające na ograniczenie tego procesu. Następnie przedstawiła najważniejsze obszary zastosowania tyrozynazy jako biokatalizatora, m.in. w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, do produkcji biosensorów, czy w bioremediacji. W kolejnym rozdziale Autorka opisała zalety biokatalizacji i wskazała metody poprawy stabilności enzymów jako biokatalizatorów, podkreślając szczególne znaczenie procesu immobilizacji. Pewien niedosyt budzi ogólne i krótkie przedstawienie tej tematyki, szczególnie w zakresie badań dotyczących immobilizacji tyrozynazy oraz wykorzystania jej w konkretnych procesach, tym bardziej, że już w następnym rozdziale Doktorantka wskazuje proces immobilizacji tyrozynazy jako jeden z celów pracy. Autorka szerzej omówiła ten temat w rozdziale „Omówienie wyników”.

Rozdział „Założenia i cel pracy” zawiera nie tylko cele postawione w pracy, ale także jasne uzasadnienie wyboru konkretnych procesów. Doktorantka wzięła tu pod uwagę zarówno względy naukowe, jak i praktyczne zastosowanie poszczególnych produktów, a przede wszystkim wskazała aspekt ekonomiczny, podając relacje cenowe substratów i produktów. Drobną uwagą do tej części dotyczy podanego na początku, dość szerokiego opisu stanu wiedzy na temat biotransformacji L-tyrozyny do L-DOPA wobec tyrozynazy. W mojej opinii ten fragment powinien być umieszczony we wstępie literaturowym, gdzie byłby świetnym uzupełnieniem a zarazem podsumowaniem stanu wiedzy.

W rozdziale 3 „Materiały i metody” (21 stron) podany został spis odczynników, metodyka izolacji i oczyszczania tyrozynazy oraz wyznaczanie jej aktywności. W kolejnych podrozdziałach opisane zostały procesy immobilizacji na wybranych nośnikach, gdzie Autorka przedstawiła m.in. czytelny schemat i opisała etapy otrzymywania agregatów CLEA i ich charakterystyki. Opisała również metodykę badawczą i analityczną stosowaną w procesach biotransformacji oraz procedury wyznaczania stabilności badanych preparatów enzymatycznych.

Rozdział „Omówienie wyników” (85 stron) rozpoczyna wstęp zawierający opis stanu wiedzy z zakresu zastosowania tyrozynazy jako biokatalizatora w różnych, ważnych procesach biotransformacji oraz wskazanie immobilizowanych preparatów o najwyższej aktywności. W kolejnym podrozdziale Doktorantka przedstawiła badania nad otrzymywaniem sieciowanych agregatów CLEA. Tutaj również rozpoczęła od ogólnego wstępu literaturowego, nie podała jednak zbyt wielu szczegółów dotyczących konkretnych wyników opisanych w literaturze, a skupiła się raczej na właściwościach otrzymywanych preparatów. W dalszej części p. mgr Cieńska przedstawiła wyniki swoich badań, m.in. wpływu szeregu czynników (np. stężenia aldehydu glutarowego, dodatku albuminy wołowej, temperatury i pH) na wydajność immobilizacji i aktywność otrzymanych preparatów enzymatycznych. Ciekawym podejściem było wykorzystanie tyrozynazy o różnych stopniach czystości (w formie ekstraktu po izolacji z *Agaricus bisporus* oraz preparatu wstępnie oczyszczonego przez wysalanie), co mogłoby w przyszłości wpłynąć na obniżenie kosztów otrzymywania takich biokatalizatorów. W podsumowaniu tej części, Autorka podała warunki, w których badane biokatalizatory wykazują najwyższą aktywność. Stwierdziła również, że tyrozynaza w postaci CLEA cechuje się wyższą stabilnością w środowisku zasadowym, jak również stabilnością termiczną w porównaniu z enzymem natywnym. Doktorantka porównała uzyskane wyniki z danymi literaturowymi oraz podjęła próbę wyjaśnienia zwiększonej aktywności i stabilności otrzymanych preparatów, wskazując przy tym na istotną rolę dodatku albuminy wołowej. Bardzo istotnym fragmentem badań, było sprawdzenie możliwości łatwego oddzielenia tyrozynazy w postaci CLEA od mieszaniny reakcyjnej.

Doktorantka najpierw przedstawiła istniejące w przemyśle metody, jednak doszła do wniosku, że nie są one odpowiednie dla agregatów CLEA, ze względu na duży rozrzut wielkości cząstek biokatalizatora. Zaproponowała również metody membranowe, ale jak sama stwierdziła, są one zbyt drogie do zastosowania w skali przemysłowej. Uzyskane na tym etapie wyniki zdecydowały o wyborze innej metody immobilizacji tyrozynazy do dalszych badań. Na podstawie dotychczasowych doświadczeń zespołu badawczego p. prof. Bryjak, wytypowany został nośnik celulozowy Granocel, niemodyfikowany, jak również modyfikowany diwinylosulfonem. Dla obu typów nośnika Doktorantka przeprowadziła badania stabilności w różnych reaktorach (zbiornik z mieszadłem, reaktor z wstrząsanym złożem katalizatora, kolumna ze złożem upakowanym), kontrolując strukturę nośnika. Dla reaktora w postaci kolumny z upakowanym złożem określiła również zmiany natężenia przepływu strumienia cieczy oraz objętości złoża. W podsumowaniu tego rozdziału jeszcze raz przedstawiła najważniejsze wyniki dotyczące immobilizowanej tyrozynazy w postaci CLEA oraz doboru układu reakcyjnego w odniesieniu do samego nośnika Granocel. Kolejna część rozprawy poświęcona jest badaniom biotransformacji konkretnych związków w obecności tyrozynazy. W mojej opinii dyskusja, szczególnie ta przedstawiona w podrozdziale 4.2.1, byłaby dużo bardziej czytelna, gdyby Doktorantka przedstawiła na początku schematy reakcji, które badała, a dopiero potem przeszła do omawiania analizy substratów i produktów w reakcjach biotransformacji. Bez tego, sama dyskusja widm UV-VIS i MS jest trochę chaotyczna. Ciekawy jest natomiast kolejny fragment pracy, w którym omówione zostały wpływy stężenia tlenu oraz występujących oporów dyfuzyjnych, jak również możliwości sorpcji substratów i produktów na stosowanym biokatalizatorze. Aspekty te są często pomijane w badaniach laboratoryjnych, a jednocześnie niezwykle istotne w skali przemysłowej. Doktorantka w podsumowaniu rozdziału podała najbardziej korzystne warunki prowadzenia procesu biotransformacji, w zależności od substratu i układu reakcyjnego. Wskazała również na konieczność stosowania dodatkowych ilości tlenu w przypadku reakcji hydroksylowania L-tyrozyny i tyrozolu.

Kolejne rozdziały dotyczą konkretnego zastosowania tyrozynazy w formie natywnej i immobilizowanej na nośniku Granocel, w reakcjach hydroksylowania L-tyrozyny do L-DOPA, tyrozolu do 3-hydroksytyrozolu, a także przemiany kwasu 3-hydroksyantranilowego do kwasu cynobrowego. W pierwszym przypadku (L-tyrozyna do L-DOPA), były to badania uzupełniające, gdyż duża część wyników z tego zakresu została opisana w pracy doktorskiej p. dr inż. Karoliny Labus. Doktorantka wyraźnie zaznaczyła jednak wyniki otrzymane wcześniej, co pozwoliło jasno ocenić Jej wkład. Autorka zwróciła uwagę na konieczność stosowania kwasu askorbinowego, jako czynnika redukującego dopachinon do L-DOPA. Udowodniła jednocześnie dezaktywujący wpływ kwasu askorbinowego i L-DOPA na tyrozynazę i podkreśliła korzystny wpływ dodatkowych ilości tlenu na szybkość reakcji i wydajność L-DOPA. W wyniku przeprowadzonych badań wskazała jako najbardziej korzystny układ: enzym w formie natywnej, bufor boranowy, pH 7,0 oraz dodatek zarówno kwasu askorbinowego jak i hydroksyloaminy. Wprawdzie wyniki uzyskane dla tyrozynazy immobilizowanej były lepsze, ale Autorka wykazała, że stosowane preparaty nie były stabilne w kolejnych szarżach. Ze względu na stosowanie różnych warunków i dodatków w reakcji z buforem fosforanowym i boranowym (m.in. dodatek hydroksyloaminy) trudno jest porównywać wyniki tych badań. Doktorantka udowodniła jednak, że dzięki zastosowaniu buforu boranowego, możliwe było znaczące ograniczenie zjawiska inhibicji produktowej enzymu. Moim zdaniem, rozważania i wnioski na temat ekonomicznej zasadności użycia konkretnego układu reakcyjnego, należałoby poprzedzić analizą kosztów, co zresztą nie było

przedmiotem niniejszej pracy. Następnym badanym procesem było otrzymywanie 3-hydroksytyrozolu z tyrozolu. Tutaj również Doktorantka zastosowała tyrozynazę natywną i immobilizowaną oraz przetestowała wpływ kilku czynników na stabilność enzymu oraz wydajność produktu. Wnioski przedstawione jako podsumowanie tej części były zbliżone do tych uzyskanych dla procesu otrzymywania L-DOPA. Zaobserwowano natomiast, że inaktywacja produktowa tyrozynazy nie była tak silna jak w przypadku hydroksylowania L-tyrozyny. Udało się też uzyskać prawie 100% stopień przereagowania substratu. Ostatnim, a zarazem najbardziej wnikliwie zbadanym procesem było otrzymywanie kwasu cynobrowego. W tym przypadku Doktorantka uzyskała dobrą stabilność tyrozynazy natywnej i immobilizowanej w środowisku reakcji, prowadząc proces w układzie okresowym (reaktor z mieszadłem oraz reaktor z wytrząsaniem), jak również półokresowym z dozowaniem substratu. W tym ostatnim układzie, dla enzymu immobilizowanego, zauważyła jednak wytrącanie się produktu, w miarę jego nagromadzenia się w mieszaninie reakcyjnej. Autorka udowodniła również, że substrat i produkt nie powodują znaczącej inhibicji enzymu. Większym problemem była ich rozpuszczalność w środowisku reakcji. Doktorantka przeprowadziła również wnikliwe badania biotransformacji kwasu 3-hydroksyantranilowego w dwóch układach przepływowych, tj. w kolumnie ze złożem upakowanym, w postaci tyrozynazy immobilizowanej na nośniku Granocel oraz w mikroreaktorze, w którym tyrozynaza była immobilizowana na monolicie krzemionkowym. Doszła jednak do wniosku, że ze względu na prawdopodobny deficyt tlenu oraz możliwość wytrącania się produktu reakcji, takie systemy są nieodpowiednie do prowadzenia badanego procesu biotransformacji. Podsumowując, bardzo obszerna część „Omówienie wyników” zawiera wiele ciekawych i cennych wskazówek technologicznych, dotyczących procesów biotransformacji wybranych fenoli, a podane po każdym podrozdziale podsumowania pozwalają dostrzec najważniejsze z nich.

W rozdziale „Podsumowanie rozprawy i wnioski” Autorka jasno i rzeczowo przedstawiła najważniejsze rezultaty uzyskane w trakcie realizacji postawionego na początku celu pracy oraz wynikające z nich wnioski. Zasugerowała, że ze względu na występującą dezaktywację tyrozynazy w trakcie biotransformacji L-tyrozyny i tyrozolu, ewentualne wdrożenie takiego procesu do przemysłu wymagałoby znacznych nakładów finansowych oraz opracowania warunków będących kompromisem pomiędzy uzyskaniem wysokich wydajności produktu a eliminacją zjawiska inhibicji enzymu. Dużo bardziej obiecujący wydaje się być proces utleniającej dimeryzacji kwasu 3-hydroksyantranilowego do kwasu cynobrowego. Na końcu tego rozdziału Doktorantka zamieściła 9 najważniejszych wniosków ze swojej pracy.

Praca jest napisana poprawnie, z zachowaniem prawidłowych proporcji poszczególnych rozdziałów. Należy podkreślić, że cytowane są aż 254 pozycje literaturowe, w dużej części opublikowane w ostatnich 10 latach, co świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia badań w tej tematyce. Szeroki zakres opisanych badań, udokumentowany odpowiednimi wykresami, tabelami oraz wnikliwą analizą wyników i konkretnymi wnioskami, potwierdzają natomiast duży nakład pracy oraz umiejętności p. mgr Cieńskiej.

Strona merytoryczna nie budzi większych zastrzeżeń, jednak przy tak obszernej pracy nieuniknione są pewne niedopatrzenia czy błędy edytorskie i językowe, które w niewielkim stopniu wpływają na ostateczną, pozytywną ocenę pracy. Z obowiązku recenzenta podaję wybrane uwagi oraz nieścisłości, które zauważyłam podczas analizy rozprawy:

1. W pracy przydałby się spis stosowanych skrótów i nazw zwyczajowych oraz ich wyjaśnienie, tym bardziej, że często stosowane są nazwy zwyczajowe. Znalazłam również sporo błędów w nazwach związków.
2. Omówienie struktury tyrozynazy byłoby o wiele bardziej czytelne, gdyby Doktorantka przedstawiła odpowiednie rysunki przedstawiające strukturę całego enzymu, jak również centrum aktywnego.
3. Str. 35. Doktorantka podaje, że „za jedną jednostkę aktywności enzymu (1U) przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach testu powoduje przyrost absorbancji o 0,001 w czasie 1 minuty. Jest to skrót myślowy, więc dobrze byłoby go wyjaśnić.
4. Str. 35. W przypadku preparatów immobilizowanych na nośniku Granocel lub CLEA do oznaczenia aktywności enzymu stosowano określoną objętość preparatu w buforze. Czy zawiesina była na tyle jednorodna, że uzyskano powtarzalne wyniki?
5. Str. 44 i 46. Doktorantka podaje, że stężenia związków określano na podstawie krzywych wzorcowych, ale przedstawia jedynie wartości R^2 . Przydałby się chociaż równania tych krzywych.
6. Str. 60 i 62 – A. Skoro przy 5% stężeniu aldehydu glutarowego otrzymano najlepsze wyniki, czy nie byłoby uzasadnione dalsze zwiększenie stężenia tego związku? B. Jaki był błąd wyznaczania wydajności immobilizacji i stabilności preparatów enzymatycznych?
7. Str. 71 Rys. 21 i Tab. 4 – W opisie rysunku podana jest informacja, że „jako kontrolę użyto nośnik niemieszany”. Czy był to nośnik modyfikowany DWS czy niemodyfikowany?
8. Str. 82, rys. 25. Doktorantka pisze o występowaniu przynajmniej dwóch izoform tyrozynazy w badanym preparacie, na podstawie przebiegu krzywej Michaelisa-Menten. Przydałaby się wcześniejsza informacja (np. w części literaturowej) o możliwości występowania takich izoenzymów i ewentualna ich charakterystyka. Należałoby również podać informację, że taki przebieg krzywej nie był wynikiem błędów analitycznych (brak jest słupków błędów a także informacji na temat możliwości zafałszowania wyników analiz spektrofotometrycznych przy stosunkowo wysokich stężeniach substratu - kwasu 3-hydroksyantranilowego, stosowanych w badaniach kinetycznych).
9. Str. 93 i następane. Czy α_{L-DOPA} oznacza stopień przereagowania L-DOPA, skoro badana jest reakcja hydroksylowania L-tyrozyny do L-DOPA? Czy Doktorantka rzeczywiście badała przemianę L-DOPA do dopachinonu? Jeżeli nie, to należy raczej mówić o wydajności L-DOPA, a nie o stopniu przereagowania. Ta sama uwaga dotyczy pozostałych procesów opisywanych w całej pracy, gdzie zamiennie stosowane są określenia „stopień przereagowania” i „wydajność”.

Wybrane błędy edytorskie i skróty myślowe (nie wymagają komentarza Doktorantki):

- a. Str. 12 rys. 4 – raczej nie używa się symbolu Cu^{1+} (wystarczy po prostu Cu^+).
- b. Str. 18. Niefortunne stwierdzenie: „substrat difenolowy....przerzuca proton na uprotonowany nadtlenuk w centrum aktywnym...”
- c. Str. 18 rys.9. Brak Cu^0 na schemacie (deakt-Tyr).
- d. Str. 30. Przy opisie doniesień literaturowych przydałby się odnośnik do odpowiednich publikacji.
- e. Str. 49. Skrót myślowy: „złoża stabilizowano przez 15 min przepływem....”

- f. Str. 51. Tytuł rozdziału 3.2.2. Moim zdaniem bardziej poprawny byłby tytuł: Wpływ składników mieszaniny reakcyjnej na aktywność tyrozynazy, zamiast: „Stabilność tyrozynazy w składnikach mieszaniny reakcyjnej”.
- g. Str. 69 i inne. Doktorantka używa pojęcia „reaktory wstrząsane”. Bardziej poprawne byłoby chyba sformułowanie: reaktory z wytrząsaniem.
- h. Str, 73 tab. 5. Raz podany jest skrót DWS a raz DVS
- i. Str. 75. Skrót myślowy: „spadek strumienia”. Chodziło prawdopodobnie o obniżenie natężenia przepływu.
- j. Str.76. Skrót myślowy: „...górne warstwy były unoszone nadawanym z góry strumieniem...”
- k. Str. 93. A. Niefortunne stwierdzenia: „...szybkość przyrostu produktu w obu układach systematycznie maleje i po 80 min procesu osiąga wartości przereagowania....”. B. „ilość ekwiwalentów aktywności tyrozynazy....”.
- l. Str. 101. „Tyrozynaza immobilizowana zachowuje ponad 90% stabilności”; powinno być raczej aktywności.
- m. Str. 105 tab.10; str. 120, tab.13.; str. 138 tab. 14; Symbol P sądząc po jednostce (μmol) nie oznacza masy produktu a ilość moli produktu.
- n. Str. 108, rys. 37 – brak linii przerywanej (zmiany stężenia O_2).
- o. Str. 117. Niezbyt poprawne zdanie: „...zastosowanie większej obojętności enzymu immobilizowanego pozwala tylko w niewielkim stopniu na zwiększenie stabilności operacyjnej tyrozynazy”.
- p. Str. 123. Niezbyt poprawne określenie „częściowa niestabilność produktu...”.
- q. Str. 128. Niezbyt poprawne określenie: „wydajność pod względem wiązania jednostek aktywności...”. Immobilizuje się enzym, a nie jednostki aktywności.
- r. Str. 131. Skrót myślowy: „ ...popularność reaktorów kolumnowych wynika z ich wysokiej aktywności w przeliczeniu na objętość reaktora...”. Sam reaktor kolumnowy nie jest przecież aktywny.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, zawiera wiele ciekawych wyników badań dotyczących zastosowania tyrozynazy w biotransformacjach związków z grupy fenoli. Doktorantka wykazała się dużymi umiejętnościami w wykorzystaniu i analizie danych literaturowych, planowaniu doświadczeń, ich realizacji oraz formułowaniu wniosków. Na podkreślenie zasługuje wielokierunkowe podejście do badanych procesów, z uwzględnieniem istotnych technologicznie problemów. Świadczy to o nakładzie pracy włożonej w realizację założonego na początku celu oraz o dojrzałości naukowej Doktorantki. Na dorobek naukowy składa się pięć publikacji, w tym jedna z listy JCR (IF 2,806), jedna w czasopiśmie punktowanym przez MNiSW (7 p.), jedna w PhD Interdisciplinary Journal oraz 2 w materiałach pokonferencyjnych. Swoje wyniki Autorka prezentowała również na 8 konferencjach (w tym 3 wystąpienie). Doktorantka była również jednym z Wykonawców w granie strukturalnym w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

Uważam, że rozprawa doktorska pt. „Biotransformacje związków fenolowych z wykorzystaniem tyrozynazy z *Agaricus bisporus* w formie natywnej i immobilizowanej” spełnia wszystkie wymogi 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 oraz Rozporządzenia MNiSW z dnia 03.10.2014 r. (rozdział 1 § 6 ust.1. pkt 4), w związku z czym wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Małgorzaty Cieńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Danuta Gillner