



Wrocław, 06.08.2018

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

Praca doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Cieńskiej została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Bryjak.

Przedstawiona do oceny praca wpisuje się w zakres badań prowadzonych przez grupę badawczą Promotora pracy w zakresie technik immobilizacji oraz charakterystyki preparatów enzymatycznych. Pani prof. Jolanta Bryjak jest uznaną specjalistką w zakresie unieruchamiania enzymów – w tym nurcie prowadzonych przez nią badań jest zlokalizowana recenzowana praca doktorska.

Stanowiącą przedmiot badań tyrozynaza (oksydaza polifenolowa) jest szeroko rozpowszechnionym w naturze enzymem należącym do klasy oksydoreduktaz o wysokim potencjale aplikacyjnym. Dzięki podwójnej aktywności katalitycznej oraz szerokiej specyficzności substratowej, obejmującej nie tylko małe związki fenolowe, ale także grupy fenolowe wchodzące w skład peptydów i białek, może znaleźć wykorzystanie w przemyśle farmaceutycznym (produkcja L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA)), w przemyśle spożywczym (fermentacja herbaty, produkcja nabiału, wyrobów mięsnych), przemyśle kosmetycznym czy bioremediacjach. Zatem podjęcie próby zbadania możliwości zastosowania tyrozynazy z *Agaricus bisporus* do syntezy L-DOPA, 3-hydroksytyrozolu oraz kwasu cynobrowego z uwzględnieniem badań dotyczących zjawiska inaktywacji samobójczej jest jak najbardziej uzasadnione.

Celem swoich badań Autorka uczyniła wykazanie zasadności stosowania tyrozynazy z *A. bisporus* (pieczarki dwuzarodnikowej) do hydroksylacji monofenoli do difenoli na przykładzie otrzymywania L-DOPA oraz 3-hydroksytyrozolu w typowych układach reakcyjnych oraz w



procesach wykorzystujących kompleksowanie difenoli przez jony boranowe. Eksperymenty zostały zaprojektowane w sposób umożliwiający porównanie procesów prowadzonych z udziałem enzymu w formie natywnej i immobilizowanej. Zwrócenie szczególnej uwagi na występowanie inaktywacji samobójczej, ograniczenie tego zjawiska poprzez immobilizację enzymu, dodatkowo wykorzystanie taniego źródła enzymu oraz racjonalny stopień oczyszczenia preparatu stanowią o możliwym charakterze aplikacyjnym proponowanych rozwiązań.

Badania były współfinansowane ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego z projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” (POIG 01.03.01-00-158/09).

Przedstawiona do oceny dysertacja jest opracowaniem naukowym liczącym 179 stron zaopatrzoną w 14 tabel, 47 rysunków, 4 załączniki oraz 255 pozycji piśmiennictwa. Rozprawa została podzielona na 5 rozdziałów obejmujących: wstęp literaturowy, założenia i cel pracy, materiały i metody, omówienie wyników, podsumowanie rozprawy i wnioski. Konstrukcję pracy poprzedza streszczenie, a uzupełniają umieszczone na końcu załączniki, bibliografia oraz spis dorobku naukowego autorki. W opinii recenzentki odbiór i ogólną przejrzystość pracy poprawiłby wykaz stosowanych skrótów i symboli.

Wprowadzeniem do opisu zrealizowanych badań jest 27-stronnicowy „Wstęp literaturowy” poprzedzony „Streszczeniem”. W syntetycznie napisanym, dwustronicowym „Streszczeniu” Doktorantka przedstawiła oprócz przesłanek do podjęcia badań, najistotniejsze wyniki swojej pracy. „Wstęp literaturowy” został podzielony na cztery główne części. W pierwszej części zatytułowanej „Budowa i fizjologiczne funkcje tyrozynazy” autorka wskazuje istotny udział tego enzymu w syntezie melanin obecnych w skórze czy neuromelanin obecnych w mózgu kręgowców, udział w mechanizmie sklerotyzacji egzoszkieletu i ochronie przed uszkodzeniami u bezkręgowców, a także w kształtowaniu cech organoleptycznych rodzynek, fermentacji ziaren kakaowca czy liści herbaty. Istotny fragment tej części pracy poświęcony jest opisowi szczegółowej struktury tyrozynazy pochodzącej z *A. bisporus*. W drugiej części wstępu literaturowego czytelnik odnajduje dokładne omówienie szlaków katalitycznych z udziałem tyrozynazy oraz charakterystykę zjawiska zwanego inaktywacją samobójczą, którego



mechanizm nie został jeszcze do końca poznany, a autorka zmierzy się z nim w dalszej części pracy. Kolejny fragment wstępu opisujący potencjał aplikacyjny tyrozynazy zaopatrzonej jest w przejrzystą tabelę zawierającą szereg odniesień do pozycji literaturowych związanych z zastosowaniem tego enzymu. Autorka kończy „Wstęp literaturowy” krótką charakterystyką biotechnologicznych metod modyfikacji enzymów prowadzących do poprawy ich specyficzności substratowej, aktywności, selektywności, optimum pH i temperatury. Tu skupia się na metodach immobilizacji wskazując je, jako najlepsze z metod modyfikacji tyrozynazy. Ten fragment wstępu teoretycznego, zdaniem recenzentki, mógłby zostać wzbogacony o bardziej szczegółową charakterystykę metod unieruchamiania białek na nośniku.

Część literaturowa pracy napisana jest w sposób spójny i logiczny, co świadczy o szerokiej wiedzy Pani mgr inż. Małgorzaty Cieńskiej w tej dziedzinie. Zestawienie literatury jest zrobione rzetelnie, na co wskazuje zgromadzenie obszernego materiału literaturowego, umiejętny dobór pozycji oraz przejrzyste przedstawienie najważniejszych zagadnień ściśle korelujących z tematyką badawczą. Warte podkreślenia są również opracowania własne szeregu rysunków, schematów oraz mechanizmów w istotny sposób poprawiające odbiór tekstu.

Cel pracy został jasno sformułowany, a przedstawiona koncepcja rozwiązania problemu badawczego jest klarowna.

W części eksperymentalnej zatytułowanej „Materiały i metody” podano prosty i tani sposób izolowania tyrozynazy z pieczarek dwuzarodnikowych, pomiar stężenia oraz oznaczanie aktywności enzymu. W dalszej części przedstawiono oprócz sposobów immobilizacji enzymu z wykorzystaniem nośnika ziarnistego z mikrokrystalicznej celulozy – Granocel-2000 oraz na monolicie krzemionkowym, sposób immobilizacji bez użycia nośników, w postaci sieciowanych agregatów (CLEA). Zamieszczono także informacje o metodach pomiarowych zastosowanych do analizy fizykochemicznej i morfologicznej uzyskanych układów, a także do oceny ich aktywności katalitycznej oraz stabilności.

Najobszerniejsza część pracy, zawierająca omówienie wyników liczy 84 strony. Podzielona jest na pięć części, które stanowią o doborze układu nośnik-enzym oraz doborze typów reaktora, biotransformacji z udziałem tyrozynazy natywnej i immobilizowanej, dimeryzacji kwasu 3-



hydroksyantranilowego do kwasu cynobrowego, przekształceniu L-tyrozyny w L-DOPA, oraz tyrozolu w 3-hydroksytyrozol. W ramach tej części pracy Pani Małgorzata Cieńska w szczególności podjęła się:

- doboru metod immobilizacji tyrozynazy
- dostosowania układów aparaturowych do wybranego preparatu enzymatycznego
- ograniczenia zjawiska inaktywacji samobójczej poprzez dobór składu mieszanin reakcyjnych
- zbadania stabilności enzymu w obecności składników mieszaniny reakcyjnej
- zbadania stabilności operacyjnej immobilizowanej tyrozynazy.

W rozdziale „Omówienie wyników” na szczególne wyróżnienie zasługuje dojrzały sposób prowadzenia dyskusji badań własnych Doktorantki z wiedzą dostępną w literaturze fachowej. Warto podkreślić również fakt, iż każdy rozdział tej części dysertacji Autorka kończy syntetycznym podsumowaniem informacji w nim zawartych. Jest to w opinii recenzenta doskonale rozwiązanie ułatwiające lekturę pracy. Czytając tę część Dysertacji jednak nie mogłam oprzeć się wrażeniu braku rozdziału poprzedzającego, w którym Autorka powinna zwięźle przedstawić wyniki badań własnych.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Cieńskiej zaliczam:

- Otrzymanie i późniejsze wykorzystanie w badaniach wysokiej jakości preparatu tyrozynazy z *A. bisporus*. Zabieg ten znacząco obniżył koszty pozyskiwania tyrozynazy, a tym samym badań własnych, co zwiększyło ich walor aplikacyjny.
- Wykonanie preparatu tyrozynazy immobilizowanej w postaci sieciowanych agregatów (CLEA), dobranie warunków immobilizacji oraz wykonanie charakterystyki aktywnościowej.
- Udowodnienie, iż tyrozynaza immobilizowana kowalencyjnie na złożu celulozowym DEAE-Granocel może być stosowana w reaktorach mieszalnikowych zawierających 1 lub 50% objętości roboczej reaktora lub w kolumnie ze złożem upakowanym z uwzględnieniem konieczności długotrwałej stabilizacji złoża.
- Opracowanie procedury immobilizacji tyrozynazy na monolicie krzemionkowym



- Udowodnienie, iż nasilenie zjawiska inaktywacji samobójczej tyrozynazy zależy od zastosowanego substratu a najsilniej jest wyrażone w obecności substratu fizjologicznego.
- Podjęcie ambitnej próby zmierzenia się z postulowanym przez Marin-Zamora i współpracowników problemem inaktywacji samobójczej, który w świetle badań autorów można byłoby zminimalizować stosując 0,5 M bufor boranowy o pH 9,0 (kompleksowanie difenolu i kwasu askorbinowego) oraz 6,7 mM hydroksyloaminy (reaktywacja *oksy-Tyr*). Doktorantka udowodniła, iż możliwość prowadzenia procesu hydroksylacji L-tyrozyny do L-DOPA z udziałem enzymu natywnego i immobilizowanego jest ograniczona występowaniem silnej inaktywacji samobójczej enzymu w obecności naturalnego substratu, która może być w niewielkim stopniu zmniejszona poprzez immobilizację enzymu i wykorzystanie czynnika kompleksującego L-DOPA i kwas askorbinowy. Pani Małgorzata Cieńska wykazała, iż niewystarczająca stabilność operacyjna preparatu immobilizowanego wyklucza jego zastosowanie w procesie, natomiast dopuszcza możliwość prowadzenia procesu z udziałem enzymu natywnego w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 1 mM L-tyrozynę, 2 mM kwas askorbinowy i 6,7 mM hydroksyloaminę w 0,5 M buforze boranowym o pH 7,0.

Mimo ogólnie bardzo pozytywnego wrażenia, co do uzyskanych wyników i ich prezentacji, pozwałam sobie mieć kilka pytań i uwag do tej części pracy. Wymieniam je poniżej.

- Czym, kierowano się w doborze nośników w procesie immobilizacji tyrozynazy?
- Czym, oprócz wskaźnika ekonomicznego bazującego na dobrej relacji ceny substratu do produktu, kierowano się przy wyborze substratów do badań?
- Pewne zastrzeżenia budzi jakość rysunków 23 i 43 przedstawiających widma masowe produktów biotransformacji. Wszystkie wartości łącznie z wartością dla pików jonu molekularnego są nieczytelne.
- Na stronie 125 w ostatnim akapicie odnalazłam kilka nieścisłości. Autorka informuje, że analiza widma masowego potwierdziła obecność kwasu cynobrowego jako głównego powstającego produktu i jednocześnie nie stwierdzono występowania innych pików, mogących świadczyć o obecności dalszych produktów reakcji enzymatycznych bądź nieenzymatycznych przemian (słowo „główny” sugeruje obecność kilku produktów biotransformacji). Dalej czytamy



„Jednakże podczas procesu oczyszczania mieszanin poreakcyjnych część produktów reakcji nie uległa wytrąceniu i nadal pozostawała w roztworze; nie udało się zatem w pełni wyizolować wszystkich związków powstających podczas procesu”. Drugie zdanie sugeruje, iż były jednak produkty inne niż kwas cynobrowy. Szkoda zatem, że autorka nie pokazuje chromatogramów HPLC-MS mieszanin poreakcyjnych, a jedynie widma masowe wyizolowanego produktu.

Proszę wyjaśnić, jak przebiegał proces izolowania i oczyszczania produktów z mieszaniny poreakcyjnej oraz jakich przekształceń dotyczą tzw. dalsze nieenzymatyczne przemiany powstających produktów.

Sygnalizowane w recenzji pewne niejasności czy sugestie nie wpływają na wartość i pozytywny odbiór pracy. Praca jest napisana logicznie, wzbogacona graficznie rysunkami, poprawna językowo i stylistycznie (nie dopatrzyłam się istotnych błędów stylistycznych, a ilość „literówek” jest niewielka). Rozprawa zawiera elementy nowości naukowej, a wymienione powyżej uwagi polemiczne i pytania nie umniejszają mojej wysokiej ocenie recenzowanej pracy. Doktorantka uzyskała szereg ciekawych rezultatów, których wartość merytoryczną podkreśla pięć opublikowanych prac oraz osiem prezentacji konferencyjnych. Przedstawione w dysertacji rezultaty świadczą o samodzielności i zręczności Autorki w wykonywaniu często niełatwych prac eksperymentalnych oraz dobrym opanowaniu technik badawczych. Autorka wykazała się zdolnością prowadzenia własnych studiów literaturowych, opracowania własnych metod rozwiązania postawionego problemu, krytycznej oceny faktów, interpretacji wyników oraz jasnego formułowania wniosków.

W związku z powyższym uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszelkie wymagania i warunki ujęte w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 roku i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Małgorzaty Cieńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

E. Kostrzewska-Susłowa
dr hab. inż. Edyta Kostrzewska-Susłowa, prof. nadzw.