

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Lucyny Balcerzak pt. „Wpływ pochodnych terpenoidowych na wzrost cyjanobakterii”. Praca została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Lochyńskiego i dr hab. Jacka Lipoka, prof. Uniwersytetu Opolskiego.

Dotychczas przyporządkowano ok. 2700 gatunków sinic co jest kroplą w morzu prognozowanego bogactwa tych fotoautotroficznych mikroorganizmów. Mamy więc do dyspozycji ogromne, nieznanne i różnorodne bogactwo bakterii, które w wielu przypadkach są już wykorzystywane w wielu dziedzinach życia lecz także bywają często niepożądanym produktem geniuszu stwórcy. Jak na razie mamy czasami kłopoty z okiełznaniem i zagospodarowaniem tych mikroorganizmów chociażby w sytuacji szkodliwego zarastania i zakwitu w akwenach wodnych. Obecnie znanych jest kilka substancji, które hamują rozwój cyjanobakterii ale potrzeby są znacznie większe.

Stąd wywodził się pierwszy nurt badań poznawczych ocenianego doktoratu obejmujący oddziaływania monoterpenoidów, nowych substancji chemicznych, na sinice. Studia takie są ważne ponieważ pozwolą ocenić ryzyko przemiany terpenów, stanowiących zanieczyszczenia powodowane przez przemysł celulozowo-papierniczy, przez sinice związane z potencjalną aktywnością biologiczną produktów tych biotransformacji. Dotychczas nie jest wiadomym jak ta klasa związków wpływa na rozwój sinic.

Drugi nurt badań dotyczył określenia korzyści wynikających z możliwości biotransformacji monoterpenoidów przez sinice, które można traktować jako naturalne „zielone” katalizatory o właściwościach jeszcze niepoznanych. Dane literaturowe wskazują fakt biotransformacji niektórych związków monoterpenowych przez cyjanobakterie jednakże mechanizm, zakres i sposób oddziaływania są niemal nieznanne.

W proponowanym w Doktoracie ujęciu jest to ciekawa i interesująca naukowa inwestycja łącząca badania stosowane z podstawowymi. Dwóch promotorów, specjalistów od strony *chemicznej* i *biologicznej*, rozwiązywanego problemu naukowego, zapewniało w miarę

bezpieczny, przynajmniej na starcie, spacer Doktorantki po interdyscyplinarnej ścieżce nauki. Nie zmienia to faktu, że satysfakcja z inwencji pogłębiającej wiedzę promotorów oraz krople potu należały do Pani mgr inż. Lucyny Balcerzak.

Recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Lucyny Balcerzak posiada typowy układ rozpraw doktorskich. Manuskrypt został napisany na 112 stronach maszynopisu. Zapleczem merytorycznym jest bibliografia zawierająca ponad 173 pozycji literaturowych.

Rozdział 1 stanowi „Wprowadzenie”, w którym doktorantka, w skondensowanej formie, oswaja czytelnika z tematyką badań. Wymienia pryncypia, opisuje fakty znane, wspomina o tych jeszcze nie poznanych, wskazuje na potrzebę i ukazuje przyczynę wyboru kierunku swoich badań informując jednocześnie w kilku zdaniach, tak na zachętę, o uzyskanych wynikach. Nie mam zastrzeżeń do tego rozdziału.

Rozdział 2 „Przegląd literatury”, zajmujący 25 stron, wprowadza czytelnika w tematykę badań. Autorka omawia w nim: terpeny i terpenoidy - w szczególności ich podział i podstawowe własności; cyjanobakterie – opisując ich systematykę, budowę komórki, zwracając uwagę na zakwity sinicowe, cyjanotoksyny oraz wykorzystanie cyjanobakterii w gospodarce człowieka. Rozdział ten dobrze wprowadza czytelnika w tematykę i zakres wykonywanych badań. Jest to dobrze, w oparciu o wartościowe źródła, napisany rozdział. Nie dostrzegłem w nim uchybień ale dostrzegłem problem do dyskusji. Na str. 26 Autorka wymienia najważniejsze i najistotniejsze cechy biotransformacji. Cytuję „*Biotransformacje są dość uniwersalnymi procesami. Praktycznie dla każdego rodzaju reakcji istnieje odpowiedni biokatalizator*”. Nasuwa mi się pytanie „Dlaczego niektóre polimery syntetyczne są tak odporne na biotransformacje/biodegradację”.

Rozdział 3 „Cel pracy”; „*cytuję za pracą*” Celem przedstawionych badań było sprawdzenie wpływu monoterpenoidów na wzrost cyjanobakterii oraz określenie zdolności tych mikroorganizmów do biotransformacji tych związków. Był on realizowany poprzez:

- Zbadanie wpływu monoterpenoidów, czyli substratów tanich, powszechnie dostępnych, będących produktami naturalnymi, na wzrost biomasy sinicowej.
- Podział monoterpenoidów, ze względu na oddziaływanie, na dwie główne grupy: ograniczające oraz wzmagające rozwój cyjanobakterii.
- Określenie wpływu monoterpenoidów na konsorcja słodkowodnych fotoautotrofów.
- Ocena działania mieszanin monoterpenoidów na poszczególne gatunki cyjanobakterii.
- Określenie zdolności wybranych gatunków sinic: *Anabaena sp.*, *Nodularia moravica*, *Chroococcus minutus* oraz *Spirulina platensis*, do biotransformacji związków

monoterpenoidowych oraz izolacja i identyfikacja produktów biokatalizy. „Koniec cytatu”.

Cel ten, postawiony przez ludzi ciekawych i ambitnych, planujący dotknięcie problemów nieznanych został zrealizowany przez Panią mgr inż. Lucyny Balcerzak bardzo dobrze.

W rozdziale 4, „Wyniki”, na 40 stronach maszynopisu zamieszczono uzyskane rezultaty badań w postaci 43 rysunków (72 wykresów, 10 zdjęć, 4 schematów i profili chromatograficznych) oraz 3 tabel. Rozdział ten zawiera wyczerpujący opis badań i ich wyniki jest napisany kompetentnie i klarownie. Z rozdziału tego czerpałem wiedzę do oceny merytorycznej.

W rozdziale 5 „Część doświadczalna” na 17 stronach Autorka opisała: mikroorganizmy i pożywki stosowane w pracy doświadczalnej – były to kultury bakterii stanowiące własność Uniwersytetu Opolskiego: gatunki fotoautotrofy słodkowodne *Anabaena sp.*, *Nodularia moravica*, *Chroococcus minutus* oraz halofilne *Spirulina platensis*. Zamieściła także struktury oraz nazwy stosowanych w badaniach 25 związków monoterpenoidowych będących własnością Politechniki Wrocławskiej. Autorka opisała wykorzystywane w pracy metody analityczne (TLC, chromatografia kolumnowa i GC-MS) oraz stosowany do badań sprzęt. Zamieściła metodykę badań cyanobakterii. To jest następny dobrze napisany rozdział, w którym zamieszczono opisy działań koniecznych do realizacji postawionego celu, dotyczących: zbadania wpływu monoterpenoidów na wzrost biomasy stosowanych cyanobakterii; określenia wpływu monoterpenoidów na konsorcja fotoautotrofów słodkowodnych hodowanych na pożywce BG11 i halofilnych *Spirulina platensis* hodowanych na pożywce ATCC1679, oraz opisała metodę hodowli tych bakterii w kolbach i fotobioreaktorze; wpływu monoterpenoidów na konsorcja słodkowodnych fotoautotrofów; oceny działania mieszanin monoterpenoidów na poszczególne gatunki cyanobakterii; określenia właściwości wybranych gatunków sinic do biotransformacji związków monoterpenoidowych oraz izolacja i identyfikacja produktów biokatalizy.

Mam pytanie. Dlaczego podłoża sterylizowano w temp. 126°C, 1,5 atm. I uwagę - podając parametry wirowania powinno podawać się nie ilość obrotów rpm (*revolutions per minute*) a względną siłę odśrodkową rcf (*relative centrifugal force*).

Rozdział 6 zawiera „Podsumowanie i wnioski”. Ten krótki rozdział (1,5 strony) opisuje uzyskane sukcesy, a takie niewątpliwie były czego dowodem jest publikacja w czasopiśmie z IF oraz streszczenie wszystkich wykonanych ważnych badań. Omawia także te

warianty, które nie dały pozytywnych rezultatów. Sądzę, iż wyniki te są równie ważne dla ostatecznego kształtu Doktoratu Pani Balcerzak jak i uzyskane pozytywne rezultaty biotransformacji monoterpenuidów przez cyjanobakterie, choć niewątpliwie mniej, z punktu widzenia Doktorantki, atrakcyjne.

Ocena merytoryczna. Nie zamierzam omawiać szczegółowo zaprezentowanych rezultatów, chciałbym jedynie zwrócić uwagę na te elementy, które w moim przekonaniu, zgodnie z moimi kompetencjami, stanowią najbardziej istotną wartość naukową pracy tej niewątpliwie pionierskiej pracy.

Autorka stwierdziła, że monoterpenuidy stosowane w testach, w większości przypadków ograniczają, w zastosowanych warunkach, wzrost cyjanobakterii. Jedynie w nielicznych układach eksperymentalnych, obecność izoprenoidów skutkowała zwiększonym rozwojem komórek. Wykazała, że każdy z zastosowanych monoterpenuidów wpływa indywidualnie na wzrost hodowli bakterii. Badane gatunki sinic odmiennie reagowały na obecność w środowisku monoterpenuidów. Monoterpenuidy, z wyjątkiem eugenolu, dodane do konsorcjów słodkowodnych cyjanobakterii w postaci mieszaniny *Anabaena* sp., *Chroococcus minutus* i *Nodularia moravica* powodowały ograniczenie ich rozwoju.

Interesujące wyniki uzyskano w przypadku (+)-3-karenu, który podczas stosowania monokultur nie działał bójczo jedynie na *Anabaena* sp. Dodany do środowiska konsorcjum cyjanobakterii słodkowodnych wzmagał ich rozwój. Podczas gdy terpentyna zawierająca w swoim składzie: (+)- α -pinen, β -pinen, (+)-3-karen i limonen, wykazała zdolność ograniczania rozwoju badanego konsorcjum. Cytral i (+)- α -pinen o wiele skuteczniej hamowały rozwój sinic rosnących w konsorcjum, niż w przypadku wzrostu w hodowlach z poszczególnymi badanymi gatunkami.

Uważam, że dostrzegalnym i niewątpliwym sukcesem autorki było znalezienie nowej drogi biotransformacji monoterpenuidów z użyciem cyjanobakterii.

Autorka wykazała fakt znamieny, że transformacja (+)-linalolu zachodziła dwuetapowo. W etapie pierwszym wytwarzany był (3*R*)-3,7-dimetylookta-1,5-dien-3,7-diol, jednak przemiana ta zachodziła bez obecności cyjanobakterii (w obecności pożywki ATCC 1679 wraz z (+)-linalolem). W drugim etapie produkt ten został bitransformowany przez *S. platensis* do 2-[(5*R*)-5-metylo-5-winylotetrahydrofuran-2-yl]propan-2-olu. Proszę Doktorantkę o przybliżenie kwestii zaczerpniętej z pracy „*Najprawdopodobniej liczne składniki używanej pożywki, w tym obecne jony metali przejściowych mogą stanowić centrum katalityczne dla zachodzącej reakcji*”.

Stwierdziła, że (1*R*,2*S*,5*R*)-mentol uległ biotransformacji do (-)-mentonu jedynie w obecności *Anabaena* sp. *S*- i *R*-karwon (+) i (-) zostały przekształcone przez wszystkie testowane gatunki słodkowodnych cyjanobakterii. Głównymi produktami był (+)- lub (-)-dihydrokarwon. *Anabaena* sp. przekształciły *S*-(+)-karwon do dihydrokarwonu oraz jako jedyne, do dihydrokarweolu. Analiza prowadzona z użyciem kolumny chiralnej wykazała obecność 3 enancjomerów dihydrokarwonu, co świadczy o zmianie konfiguracji na 5 atomie węgla w pierścieniu *S*-(+)-karwonu. Podobnie *Anabaena* sp. przekształciła *R*-(-)-karwon do dwóch enancjomerów (-)-dihydrokarwonu. Wydajność reakcji nie była duża ale droga została otwarta.

Mgr inż. Lucyna Balcerzak wskazała na gatunek *Anabaena* sp., który wykazywał największy potencjał biotransformacyjny bowiem ten gatunek katalizował największą liczbę stwierdzonych przemian.

Dostrzegam oraz uważam za wartościowe wykonane przez Autorkę badania biotransformacji prowadzonych w fotobioreaktorze co pozwoliło na ok. 60-krotne zwiększenie skali biotransformacji i wytworzenie większych ilości nowych produktów.

Wykorzystanie jako narzędzia biotransformacji cyjanobakterii było zamierzeniem nowatorskim stąd w mojej ocenie jest to w sensie poznawczym dużo. Kontynuacja i rozwijanie wytyczonego szlaku poprzez zastosowanie nowych szczepów sinic i ich konsorcjów może otworzyć nowe perspektywy zarówno w ochronie środowiska jaki i biotransformacji.

Przedstawione biotransformacje prowadzone przez fotoautotroficzne mikroorganizmy mogą być nowymi narzędziami do uzyskania substancji, które posiadają wymaganą aktywność w stosunku do innych gatunków mikroorganizmów. Procesy te mogą działać również jako metoda badań produktów metabolizmu sinic.

Pragnę podkreślić, że w tej nowatorskiej pracy wykorzystano nowoczesne techniki i takież sprzęt badawczy, bez którego wykonanie badań nie byłoby możliwe. Ale jednocześnie w pracy nie ma działań służących jedynie upiększeniu formy i treści, co oceniam pozytywnie. Dostrzegam znaczący i ciekawy potencjał rozwojowy oraz naukową wartość zaplanowanych badań, które oceniam jako bardzo wartościowe.

Praca Doktorska Pani mgr inż. Lucyny Balcerzak wskazuje, że jest Ona młodą badaczką pracowitą, dociekliwą i skuteczną w działaniu. Zakres doświadczeń i sposób ich przeprowadzenia oraz opis i interpretacja wyników wskazują na kreatywność, twórcze myślenie oraz dobre przygotowanie merytoryczne Autorki. Autorka w sposób klarowny

zaprezentowała swoje poglądy będąc na polu tematycznej dyskusji jak na razie osamotniona. Pracę tę czytałem z zaciekawieniem.

Uważam, że recenzowana praca, w zakresie nowoczesnej biotechnologii, jest wartością dodaną pokazującą nowe naturalne biokatalizatory w zastosowaniach dopiero poznawanych. Praca ta jest przykładem dobrej roboty naukowej łączącej w sobie zarówno pierwiastek poznawczy, jak i możliwość praktycznego zastosowania co jest elementem wyróżniającym.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Lucyny Balcerzak pt. „Wpływ pochodnych terpenoidowych na wzrost cyjanobakterii” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane pracom doktorskim. Wnoszę, zatem o dopuszczenie Autorki przez Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

