

Lublin, 16.08.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej magister inżynier Moniki Poznar
„Charakterystyka właściwości molekularnych i biomineralizacyjnych białka
OMM-64”**

Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Piotra Dobryszczyckiego na Politechnice Wrocławskiej. Cel pracy jest jasno i precyzyjnie sformułowany i dotyczy określenia właściwości strukturalnych oraz biomineralizacyjnych białka OMM-64 z pstrąga tęczowego. Naukowcy od dawna wiedzą, że naśladowanie natury przynosi niesamowite efekty. Biomimetyka zajmuje się badaniem rozwiązań stosowanych przez organizmy żywe i zastosowaniem ich w wielu dziedzinach życia, np. materiałoznawstwie. Organizmy żywe, stosując molekuly organiczne, potrafią wytwarzać minerały o niezwykłych właściwościach mechanicznych, np. kości. Czerpiąc inspirację z natury, wielu badaczy próbuje wykorzystać matrycę organiczną do sterowania procesem tworzenia materiałów nieorganicznych. Przedstawiona do oceny praca wpisuje się w nurt badań nad procesem biomineralizacji, w szczególności oddziaływań matryca organiczna – minerał.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska liczy 152 strony, w tym 13 tabel i 48 rysunków. W pracy wykorzystano 169 odnośników do literatury związanej z tematem, w tym 46% to prace opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat. Praca doktorska składa się z 9 ponumerowanych rozdziałów poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz spisem zastosowanych skrótów. W pierwszych trzech rozdziałach przedstawiono krótko zarys tematyki pracy, jej cel oraz zastosowane materiały i metody badawcze. Kolejne dwa rozdziały zawierają opis uzyskanych wyników oraz ich dyskusję. Pracę kończy przedstawienie dorobku naukowego i finansowego, spis tabel i rysunków, wykaz literatury oraz dodatek zawierający trzy rysunki.

Rozdział pierwszy określany jako „Wstęp” obejmuje 16 stron i stanowi przegląd literatury. Autorka omawia w nim proces biomineralizacji, w tym mechanizmy krystalizacji i rolę macierzy organicznej w tym procesie, białka inherentnie



nieuporządkowane oraz budowę narządu słuchu ryb kostnoszkieletowych. Część ta jest niezwykle krótka, ale treściwa i dobrze wprowadza w nurt podjętych badań. Niemniej jednak w mojej opinii więcej uwagi powinna Autorka poświęcić wpływie białek i aminokwasów na proces krystalizacji oraz opisać formy krystaliczne węglanu wapnia. Opis stosowanych materiałów i metod obejmuje aż 27 stron. Wynika to z dużej liczby stosowanych technik oraz bardzo starannego ich opisu.

W rozdziale czwartym zatytułowanym „Wyniki” Autorka prezentuje wyniki badań mających na celu realizację przyjętych celów badawczych. W większości wypadków uzyskane wyniki porównuje z osiągnięciami innych badaczy wyjaśniając, tam gdzie jest to konieczne, rozbieżności w uzyskanych wynikach. Rozdział zatytułowany „Dyskusja” stanowi dobre uzupełnienie opisu badań.

Osobiście brakuje mi krótkiego i syntetycznego podsumowania uzyskanych wyników, które mogłoby poprzedzić opis podrozdziału „Perspektywy dalszych badań”.

Podczas lektury dysertacji nasunęły mi się następujące pytania i uwagi:

- na rys. 4.19A błędnie wskazano jednostkę rozmiaru kryształów. Brak również danych dla stężenia białka równego $1,8 \mu\text{g/ml}$ przy stężeniu $\text{Ca}^{2+} 2\text{mM}$.
- bazując na rys. 4.19B, jakiej ilości kryształów można się spodziewać przy stężeniu białka większym niż $160 \mu\text{g/ml}$? Kształt uzyskanej krzywej może wskazywać na adsorpcję białka na powierzchni kryształów. Czy biorąc pod uwagę rozmiar i ilość kryształów lub zakładając 100% wydajność procesu, masę otrzymanych kryształów, można ocenić pojemność adsorpcyjną względem białka OMM-64?
- w jaki sposób wyznaczano procentową zawartość poszczególnych faz krystalicznych w próbkach? Czy przedstawione wyniki dotyczą ilości kryształów, czy ich masowej zawartości? Dane te powinny być przedstawione (najlepiej w formie tabeli) dla wszystkich badanych układów, a nie tylko wspomniane dla wybranych.
- na str. 99 stwierdzenie „We wszystkich próbkach zarejestrowano również obecność waterytu i aragonitu (rysunek 4.18, duże koliste kryształy wskazane strzałkami)...” jest niejasne. Którą formę krystaliczną miała na myśli Autorka? Taka sferyczna morfologia jest charakterystyczna dla waterytu, a nie aragonitu.



- morfologia kryształu zaznaczonego czarną ramką na rys. 4.18 J jest analogiczna do pozostałych sferycznych kryształów np. na rys. 4.18K i L.
 - rys. 4.28B i 4.28C są identyczne.
 - kryształy zaznaczone strzałkami na rys. 4.23 mają kształt sferyczny typowy dla waterytu, a nie igłowy. Czy Autorka dysponuje widmami Ramana potwierdzającymi ich formę krystaliczną oraz obrazami SEM w większym powiększeniu?
 - pik na widmie Ramana przy liczbie falowej 1085 cm^{-1} (rys. 4.27 i 4.28) jest charakterystyczny dla jonu węglanowego, a nie jak podaje Autorka dla „węglanu”.
 - w podrozdziale 4.5.3 „Odmiana polimorficzna kryształów CaCO_3 – mikroskopia Ramana” pokazano widma Ramana zarejestrowane tylko dla dwóch układów. Z przedstawionego opisu trudno jest więc wnioskować o wpływie białka na odmiany węglanu wapnia. Autorka stwierdza m.in., że „Dla próbek otrzymanych w obecności białka przy stosunku $\text{MgCl}_2:\text{CaCl}_2$ równym 1:1 zawartość poszczególnych odmian polimorficznych jest podobna do zarejestrowanych w próbkach pozbawionych jonów Mg^{2+} .” Niestety nie udało mi się odszukać wartości liczbowych dla tych, jak również pozostałych układów.
- Zestawienie, np. w formie tabeli, danych dotyczących form krystalicznych we wszystkich badanych układach oraz ich procentowej zawartości znacznie ułatwiło by skorelowanie wpływu białka na morfologię i formę krystaliczną wytącanego CaCO_3 .
- czy wpływ jonów Mg^{2+} na rozmiar kryształów może wynikać z innej stałej wiązania niż dla jonów wapniowych?

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom merytoryczny i świadczy o opanowaniu przez jej Autorkę wielu technik analitycznych. Poszczególne rozdziały stanowią logiczną i spójną całość. Na podkreślenie zasługuje również niezwykle staranne przygotowanie pracy pod względem edytorskim i graficznym. Tematyka podjętych badań jest bardzo interesująca, nie tylko z poznawczego, ale również praktycznego punktu widzenia. Autorka wykorzystwała bardzo dużo nowoczesnych technik analitycznych, z których wiele wymaga olbrzymiego nakładu pracy i czasu. Należy zwrócić uwagę chociażby na sam proces ekspresji



i oczyszczenia OMM-64. W mojej opinii cele postawione zostały osiągnięte. Mgr inż. Monika Poznar opracowała wydajną metodę izolacji białka z macierzy otolitów pstrąga tęczowego i wykazała, że należy ono do rodziny białek inherentnie nieuporządkowanych (IDP). Określiła również jego właściwości strukturalne oraz wpływ na proces mineralizacji węglanu wapnia. Autorka wykazała się znajomością tematu oraz umiejętnością analizy i interpretacji wyników. Równie wysoko oceniam Jej umiejętności planowania i prowadzenia badań oraz doboru technik analitycznych.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Poznar spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595, z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Aleksandra Szczeń

