



Lublin, 17 sierpnia 2017 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Jędrychowskiej

pt. „Badania aktywności biokatalizatorów unieruchomionych w zorganizowanych warstwach do zastosowań w konstruowaniu bioczuJNIKÓW”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska **mgr inż. Agnieszki Jędrychowskiej** została wykonana w Zakładzie Chemii Medycznej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Jadwigi Sołducho. Zespół naukowy pod kierunkiem Pani Profesor od wielu lat z sukcesem zajmuje się syntezą związków organicznych o elektronowym przewodnictwie i potencjale aplikacyjnym, głównie do zastosowań w urządzeniach diagnostycznych, tak więc z zaciekawieniem zapoznałam się z obecną dysertacją. Tematyka badawcza ocenianej pracy doktorskiej dotyczyła wytwarzania warstwowych układów sensorowych z wykorzystaniem enzymów z klasy oksydoreduktaz oraz ich użycie w konstrukcjach bioczuJNIKOWYCH, potencjalnie do wykorzystania w wykrywaniu związków fenolowych np. stanowiących zanieczyszczenia wody.

Dysertacja doktorska jest bardzo obszerna – przedstawiony do recenzji wydruk rozprawy stanowi bowiem 149 stron. Zawiera ona typowy dla rozpraw doktorskich podział na części: Wstęp i cele pracy, Przegląd literaturowy, Metodykę badań, Wyniki i dyskusję, Wnioski, Podsumowanie, Literaturę oraz Dorobek naukowy Doktorantki. Zamieszczony w niej również został Wykaz najważniejszych skrótów stosowanych w dysertacji.

Na wstępie Doktorantka uzasadniła własne cele badawcze w kontekście postępującej degradacji środowiska z powodu wytwarzania licznych związków toksycznych jako produktów ubocznych procesów technologicznych. Zwróciła Ona uwagę na konieczność zwiększenia efektywności jego ochrony poprzez wprowadzanie nowoczesnych technik detekcyjnych jako systemów kontrolujących poziom zanieczyszczeń. Doktorantka przede wszystkim zaznaczyła wagę związków fenolowych pojawiających się w ściekach przemysłowych i ciekach wodnych, których działanie na organizm ludzki jest toksyczne. W



tym aspekcie cel badawczy pracy doktorskiej – opracowanie metod pozwalających na wykrywanie tych związków nawet w ilościach śladowych – jest uzasadniony i niezwykle aktualny. Jednocześnie Doktorantka zaproponowała rozwiązania korzystniejsze pod względem ceny i czasochłonności w stosunku do istniejących metod, a mianowicie wytworzenie biosensorów zawierających w warstwach naniesionych na elektrody unieruchomione enzymy, których naturalnymi substratami są związki fenolowe. Aby przekonać czytelnika o zasadności zaproponowanych rozwiązań mgr inż. Agnieszka Jędrychowska zamieściła przegląd piśmiennictwa dokonany przez Nią na podstawie aktualnych artykułów naukowych z interesującego Ją zakresu tematycznego, opublikowanych przez ośrodki światowe. Dotyczył on przede wszystkim wiadomości na temat biosensorów enzymatycznych i enzymów przydatnych do ich budowy ze względu na ich specyficzność substratową i selektywność oraz zdolność do przenoszenia elektronów, co jest istotne dla zapewnienia dobrego przewodnictwa w układzie centrum aktywne enzymu – powierzchnia elektrody. Doktorantka pewną część wstępu poświęciła systemom detekcji w biosensorach, w szczególności charakterystyce biosensorów elektrochemicznych i optycznych oraz ich zastosowaniu praktycznym. W omawianej części przeglądu piśmiennictwa znaleźć można scharakteryzowanie warstw przewodzących sensora pod względem unieruchamiania białka enzymatycznego, jak również usprawnienia działania całego urządzenia. Ważna w kontekście założonego celu badawczego jest część wstępu, poświęcona immobilizacji enzymów w warstwach przewodzących i technikom metodycznym do analizy warstw na elektrodach, która to część wprowadza czytelnika w zagadnienia badawcze doktoratu. Część przeglądowa dysertacji wskazuje, że Doktorantka dysponuje aktualną wiedzą z interesującego Ją zakresu badawczego i oceniam ją pozytywnie.

W następnej części Doktorantka opisała metodykę badań własnych, w tym: techniki przygotowania i modyfikacji warstw na wykonanie podłoży, sposoby immobilizacji enzymów i określania ich aktywności oraz opis pomiarów za pomocą modeli bioczujników optycznych. W celu otrzymania matryc Doktorantka wykorzystwała specyficzne metody wytwarzania filmów molekularnych takie jak: technikę Langmuira-Schaefera, elektropolimeryzację, powlekanie obrotowe. Ta część pracy jest skonstruowana poprawnie i dla lepszego zrozumienia wzbogacona jest w schematy ilustrujące zastosowane metody.



Obszerną część dysertacji stanowią wyniki i dyskusja. Doktorantka do modyfikacji podłoży (elektrody platynowe, szkło) wykorzystwała aż 37 związków heterocyklicznych, w związku z tym część doświadczalna doktoratu była niezwykle pracochłonna. Badane związki miały charakter półprzewodnikowy i były to: alkilo-arylowe pochodne karbazolu, difenyloaminy i akrydonu, selenowe pochodne karbazolu i bis(tiofeno)pirydyny, alkilo-karbazolowe pochodne akrydonu i fenotiazyny, układy heterocykliczne na bazie tetrafenylosilanu i chemicznie syntezowane polimery przewodzące. Wszystkie związki wykorzystane w pracy doktorskiej były zsyntezowane przez zespół naukowy pod kierunkiem prof. J. Sołoducho. Aby wykazać przydatność wymienionych związków do wytworzenia matryc sensorycznych Doktorantka unieruchamiała na modyfikowanych podłożach enzymy z klasy oksydoreduktaz: lakazę i tyrozynazę, a następnie oceniała ich aktywność katalityczną oraz stabilność operacyjną. W pracy doktorskiej została również wydzielona część aplikacyjna badań, a dotyczyła ona wytworzenia modelu optycznego biosensora przydatnego do oznaczania ilościowego związków fenolowych w roztworach wodnych.

W ocenie ogólnej pracy niewątpliwie można podkreślić, że praca jest koncepcyjnie interesująca i wykonawczo dobra. Autorka kompleksowo przebadła pod kątem przydatności na warstwy bioczułnikowe bardzo dużą liczbę związków (wymienione powyżej), czyli właściwie dokonała tzw. skryningu puli związków z punktu widzenia ich późniejszych badań aplikacyjnych. Na podstawie uzyskanych przez Doktorantkę rezultatów można będzie prowadzić w przyszłości bardziej zaawansowane prace. Przeprowadzone przez panią mgr inż. Agnieszkę Jędrychowską badania, są istotne w chemii materiałowej i biotechnologii użytkowej, zwłaszcza detekcyjnej, czy diagnostycznej. Niektóre z badanych związków heterocyklicznych będą mogły być wykorzystane do konstruowania biosensorów o korzystnych cechach takich jak: możliwość doboru związku przydatnego jako matryca na powierzchni elektrody w zależności od rodzaju enzymu oksydo-redukcyjnego, doboru rodzaju metody wytworzenia cienkiej warstwy na elektrodach uzależniony od cech związku (zdolność lub nie do polimeryzacji), stabilności odpowiedzi sensora w kontakcie z substratami i utrzymanie w czasie odpowiedniego poziomu aktywności enzymów po immobilizacji, czasu życia biosensora i tzw. jego trwałości. Bardzo ważne pod względem użytkowym są też badania dotyczące sposobu wytwarzania elektrod enzymatycznych do wykrywania związków



fenolowych toksycznych dla środowiska. Doktorantka uzyskała ogromną ilość wyników i dużą wiedzę o badanych związkach, ale miała też, w związku z tym, ogromny problem z wybraniem kilku (np. 2-4) związków najbardziej przydatnych aplikacyjnie.

W trakcie czytania dysertacji nasunęły mi się uwagi związane z brakami lub nieścisłościami o charakterze merytorycznym i redakcyjno-edytorskim. Są one następujące:

- W opisie metod i analizie otrzymanych wyników znalazły się rezultaty, które zostały już opublikowane przez autorkę dysertacji. Zabrakło jednak tej informacji w podpisach do tabel i schematów, jak również nie zamieszczono tych publikacji w spisie piśmiennictwa. Doktorantka dopiero w części 5 dysertacji pt. „Wnioski” zamieściła dane dotyczące własnego dorobku publikacyjnego wykorzystanego w pracy. Wg recenzenta, dla jasności pracy, korzystniej było takie informacje zamieścić w dysertacji bezpośrednio w miejscach wykorzystania tych opublikowanych rezultatów badawczych.

- W części 3. Metodyka badań, 3.1. Odczynniki, Doktorantka wymieniła preparaty enzymatyczne, które wykorzystwała w badaniach, ale nie podała nomenklatury międzynarodowej klasyfikacji biochemicznej i charakterystyki tych preparatów np. aktywności całkowitej oraz aktywności specyficznej enzymów (aktywności przeliczanej na ilość białka), charakterystyki dotyczącej np. optimum pH i temperatury dla działania wybranych enzymów. Z pewnością wymienione dane są zawarte w ulotkach dołączonych do firmowych preparatów (tyrozynazy z *Agaricus bisporus* i lakazy z *Trametes versicolor*), natomiast tej wiedzy nie mamy w przypadku wykorzystania preparatów nie firmowych. Zgodnie z wiedzą zawartą w dysertacji preparat lakazy z *Cerrena unicolor* był otrzymany w Zakładzie Chemii Bioorganicznej PW (izolacja i oczyszczenie) i charakterystyka tego preparatu, uważam, powinna być także zamieszczona w pracy. Ponadto, aby skutecznie porównywać odpowiedzi unieruchomionych enzymów na różnych powierzchniach stałych wobec substratów i potem wybierać spośród nich najlepszą formę czy typ, powinniśmy mieć również wiedzę o porównywalnych ilościach zimmobilizowanego enzymu na badanych powierzchniach.

- W części 4 dysertacji (Wyniki i dyskusja) w opisach rezultatów własnych (tekst, schematy, rysunki i tabele) uzyskanych z udziałem lakazy Doktorantka nie podaje źródła



enzymu (inaczej „producenta” zastosowanego enzymu), czyli w tym przypadku brakuje nazwy rodzajowej grzyba, a jednak jest to wymagane w przypadku różnego pochodzenia preparatu, ponieważ lakazy otrzymane z różnych szczepów grzybowych nie są jednakowe pod względem właściwości i budowy. Wiemy np., że lakaza z *Trametes versicolor* jest enzymem indukowalnym, a lakaza z *Cerrena unicolor* formą konstytutywną i są one podobne, co do sekwencji, w 60%, a więc mogą występować różnice w stałych kinetycznych obu form, czy w ilości izoenzymów. Dlatego też w badaniach porównawczych ważne jest podawanie źródła pochodzenia enzymu wykorzystywanego do immobilizacji.

- Czym należy wytłumaczyć stosowane różnych substratów do oznaczania aktywności enzymów w metodach spektrofotometrycznej i woltamperometrii cyklicznej, a nie tych samych, co wydaje się słuszne w badaniach porównawczych? Dlaczego w eksperymentach opartych na elektrochemicznych pomiarach aktywności enzymów używane są zamiennie dwa typy elektrod odniesienia: kalomelowa lub chlorosrebrowa? Nie jestem ekspertem w dziedzinie elektrochemii i postawione pytania są może niezbyt fortunne, ale wydaje mi się, że w eksperymentach korzystnie jest wykorzystywać jak najmniej zmiennych, wtedy uzyskany wynik jest bardziej przydatny w ocenie korzyści.

- Mam pewien niedosyt po zapoznaniu się z częścią 5 pracy pt. „Wnioski”. Ta końcowa część dysertacji jest wg. mnie raczej szerokim podsumowaniem wyników, a właściwe wnioski nie zostały przez Doktorantkę sformułowane. Trochę rozumiem problemy Doktorantki z utworzeniem takich wniosków. Wynikają one z pewnością z podjęcia się przetestowania dużej liczby związków i kilku rodzajów powłok oraz wykorzystaniem 3 enzymów oksydo-redukcyjnych. Jednak, wg mnie, Autorka dysertacji powinna po analizie rezultatów pokusić się raczej o sformułowanie wniosków ogólnych, a nie umieszczać szczegółowego streszczenia wyników, które i tak się znalazło w części 6 pracy pt. „Podsumowanie wyników”.

Pod względem edytorskim praca jest przygotowana starannie, choć wkradły się nieliczne błędy stylistyczne i literowe lub inne. Wymienię tylko niektóre:

- na str. 102 pracy, w tabeli 13 zbiorczo przedstawiającej parametry użytkowe biosensorów lakazowych wyznaczonych przy użyciu katecholu, znalazły się pewne nieścisłości dotyczące wyników zakresu liniowego oraz LOD zacytowanych z pracy M. Guo i



wsp. (Sci. Technol. Mater. 2014, 15, Table 2) – wymienione wartości w obu źródłach różnią się. W dysertacji podany zakres to 1,0 – 100 μM a LOD = 29 μM , a w pracy źródłowej odpowiednio 0,39 – 8,98 i 0,31. Jednocześnie w tej samej tabeli Autorka umieściła dane dotyczące parametrów użytkowych biosensora własnego z powołaniem na pracę J. Cabaj i wsp. (Int. J. Electrochem. Sci. 2016, 11, Table 1), jednak podane wartości LOD biosensora lakazowego w obu źródłach różnią się wielkością (w pracy doktorskiej to 0,4 μM , a w publikacji 0,04 μM).

- na schematach przedstawiających aktywność immobilizowanych enzymów na powierzchni elektrody, na osiach OX nie podano jednostek cykli pomiarowych: (nr schematu: 28, 33, 38, 41, 49, 58, 59, 62, 72, 74, 78, 89, 90, 91, 93, 95, 96, 97, 101, 103, 106, 112).

Podczas zapoznawania się z pracą doktorską nasunęły mi się drobne uwagi edytorskie, które nie mają wpływu na jej ogólną ocenę. Uważam, że korzystniej dla czytelnika jest, gdy wykorzystane piśmiennictwo cytowane jest w tekście za pomocą nazwisk autorów, a nie numerów przypisanych zgodnie z kolejnością występowania. Również korzystniej jest, gdy w spisie piśmiennictwa prace podawane są w kolejności alfabetycznej wg. nazwiska pierwszego autora. Pełne tytuły prac obok tytułów czasopism też byłyby pożądane. Ponadto, używałabym w tytule rozdziału zamiast słowa „Literatura” (pozostawmy ten termin dla literatury pięknej) słowo „Piśmiennictwo”, które jest bardziej adekwatne dla prac eksperymentalnych.

Wymienione przeze mnie uwagi nie zmieniają mojej bardzo dobrej opinii o pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Jędrychowskiej.

Podsumowując: stwierdzam, że Pani mgr inż. Agnieszka Jędrychowska zrealizowała postawione cele badawcze, a praca wpisuje się w aktualny nurt badań dotyczących ochrony środowiska i zawiera istotne elementy nowości naukowej. Przedstawiona do oceny praca doktorska wykazuje, że Doktorantka posiada doświadczenie i umiejętności prowadzenia badań elektrochemicznych na warstwach polimerowych do zastosowań w biosensoryce. Jednocześnie chcę podkreślić, że wyniki wykorzystane w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w 11 czasopismach z listy JCR o łącznym współczynniku IF = 21,087 oraz opatentowane (9 patentów, 2 zgłoszenia patentowe) i zaprezentowane na licznych międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych. Na wyróżnienie zasługuje też



fakt, iż Pani mgr inż. Agnieszka Jędrychowska w trakcie realizacji pracy doktorskiej była kierownikiem grantu NCN Preludium, dotyczącego charakterystyki biokatalizatorów immobilizowanych w półprzewodnikowych warstwach układów heterocyklicznych i który zakończył się w kwietniu 2017 r.

Po analizie dokumentacji z przekonaniem stwierdzam, że **Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Jędrychowskiej spełnia, według mojej opinii, wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 r (dz. U. Nr. 65, poz. 595 z 16 kwietnia 2003 r z późniejszymi zmianami) „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i w związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Doceniając wkład pracy Doktorantki i dokonania udokumentowane publikacjami, patentami i zgłoszeniami patentowymi **wnioskuję także o wyróżnienie rozprawy.**