

Prof. dr hab. Jolanta Bryjak
Profesor emerytowany
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska

Wrocław, 24.08.2023

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Kaczmarek, zatytułowanej
„Enzymatyczna funkcjonalizacja bakteryjnej nanocelulozy”,

zrealizowanej pod opieką dr hab. inż. Anety Białkowskiej i dr inż. Karoliny Ludwickiej z
Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej.

Bakteryjna nanoceluloza to materiał wielofunkcyjny, o strukturze trójwymiarowego żelu, produkowany przez mikroorganizmy, a dzięki swoim właściwościom posiada już istniejące zastosowania oraz wskazuje się ciągle na nowe obszary wykorzystania. Wśród różnych gałęzi przemysłu, zainteresowanych bionanocelulozą, należy wymienić: produkcję komponentów do żywności, otrzymywanie opakowań do produktów spożywczych, otrzymywanie materiałów opatrunkowych i stosowanych w inżynierii tkankowej, przemysł papierniczy, tekstylny i elektroniczny. Potencjał aplikacyjny tego materiału jest ograniczany problemami związanymi ze zwiększaniem skali produkcji, gdyż bakterie wytwarzające błony celulozowe wymagają stosowania specyficznych bioreaktorów oraz żmudnej optymalizacji produkcji. Tematyka otrzymywania bionanocelulozy jest jednym z obszarów badawczych, realizowanych w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej PŁ od wielu lat. Ponieważ miałam przyjemność być recenzentką rozprawy doktorskiej, dotyczącej modyfikowania właściwości bakteryjnej nanocelulozy poprzez inżynierię roztworów, a także doboru warunków procesowych, nie chciałabym się w kolejnej recenzji powtarzać. Pragnę jedynie podkreślić, że logiczną kontynuacją tego nurtu badań jest funkcjonalizacja otrzymywanych błon, umożliwiająca poszerzenie wachlarza istniejących i potencjalnych zastosowań bakteryjnej celulozy. Dlatego uznaję przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr inż. Moniki Kaczmarek za tematycznie i naukowo aktualną i o dużym potencjale aplikacyjnym w obszarze tworzenia nowatorskich systemów pakowania i przechowywania produktów spożywczych.

Główny cel ocenianej dysertacji dotyczy efektywnej enzymatycznej funkcjonalizacji błon nanocelulozowych, produkowanych przez *Komagataeibacter xylinus* E26. Zastosowano w tym celu utlenianie celulozy lityczną polisacharydową monoooksygenazą (LPMO),

relatywnie nowym enzymem, komercyjnie niedostępnym. Uzyskany zmodyfikowany materiał został scharakteryzowany od strony morfologicznej, strukturalnej i fizykochemicznej, a jego możliwości praktycznego zastosowania testowano immobilizując modelowy enzym – lizozym – mający ugruntowaną pozycję w technologiach przemysłu spożywczego, w tym w pakowaniu i przechowywaniu produktów spożywczych.

Przedstawione opracowanie zostało przygotowane w klasycznej formie, czyli składa się ze Wstępu (26 stron), przedstawienia materiałów i stosowanych metod badawczych (41 stron), opisu uzyskanych wyników (46 stron), dyskusji (18 stron) oraz wniosków (3 strony). Na uwagę zwraca fakt, że mgr inż. Monika Kaczmarek napisała dysertację w trudniejszej formule uniwersyteckiej, w której dyskusja jest oddzielona od części przedstawiającej wyniki, a udział Wstępu nie przekracza zwyczajowego progu 20% w stosunku do całości dysertacji. Całość opracowania została poprzedzona dwujęzycznymi streszczeniami z wykazem stosowanych skrótów, opatrzona spisem 246 pozycji cytowanej literatury i zestawieniem dorobku naukowego. Rozprawa jest napisana poprawną polszczyzną, przejrzystą i z bardzo dobrą jakością prezentacji wyników w formie tabel i wykresów. Z drobnych uchybień należy wymienić nie zawsze prawidłową interpunkcję i zdarzające się kalki językowe, których najwięcej znalazło się na stronie 38 (np.: „elastyczny linker”, „N-terminalna domena”). Brakuje również pełnej informacji przy 108 odnośniku literaturowym.

We wprowadzeniu Autorka nawiązuje do faktu, iż bakteryjna nanoceluloza zazwyczaj jest funkcjonalizowana metodami chemicznymi lub fizycznymi, które są ekonomicznie uzasadnione, ale nieobojętne dla środowiska. Wprowadzanie grup funkcyjnych można też przeprowadzać enzymatycznie; szczególnie często stosuje się lakazę z mediatorami (np.: TEMPO), lipazy czy heksokinazy. Najnowszą grupą enzymów są lityczne polisacharadrydowe monooksygenazy i ich zastosowanie do wprowadzania grup funkcyjnych w strukturę błon są przedmiotem rozprawy doktorskiej. Stąd też wynika układ przeglądu literaturowego: od przedstawienia informacji o otrzymywaniu bakteryjnej nanocelulozy, poprzez opis stanu wiedzy na temat jej modyfikacji i możliwych zastosowań, po budowę i działanie litycznej polisacharydowej monooksygenazy. Jest to część bardzo starannie opracowana i bezpośrednio związana z głównym celem badań.

Część eksperymentalną rozpoczyna przedstawienie celu i zakresu wykonanych badań, przekładając teorię na konkretne zadania badawcze, takie jak: wybór formy błony nanocelulozowej do dalszej funkcjonalizacji, etap funkcjonalizacji i scharakteryzowanie uzyskanego preparatu, immobilizacja lizozymu na otrzymanym materiale oraz, wieńczące

dział, zbadanie właściwości katalitycznych preparatu enzym-nośnik i wykonanie wybranych testów funkcjonalnych.

Obszerny zakres badań, o charakterze przekrojowym, znalazł odzwierciedlenie na 41 stronach rozdziału o materiałach i stosowanych metodach. Informacje podane w tej części są kompletne i umożliwiają samodzielne odtworzenie wszystkich eksperymentów i obliczeń. Zwraca uwagę bardzo dobre opracowanie statystyczne wyników oraz dobór odpowiednich metod analitycznych i obliczeniowych do poszczególnych zadań. Nie rozumiem tylko, dlaczego enzymatyczne utlenianie prowadzono z 1,5 mg błony natywnej i 3,2 mg merceryzowanej (str. 53), co zmienia stosunek enzymu do „substratu” i może mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Przedstawienie rezultatów eksperymentów Doktorantka rozpoczęła od wyboru formy bionanocelulozy do dalszych badań (homogenat, mokre błony i po suszeniu próżniowym lub liofilizacji). Jakkolwiek sorpcja LPMO i ilość wygenerowanych miejsc utlenień nie oferowały ewidentnego wskazania na błony liofilizowane, to w połączeniu z informacją o zachowaniu przez nie pierwotnej struktury przestrzennej i łatwość przechowywania, jest to wybór uzasadniony. W dalszym etapie mgr inż. Monika Kaczmarek przedstawiła obszerny i wyczerpujący rozdział dotyczący rzeczywistej optymalizacji enzymatycznego utleniania liofilizowanej błony z wykorzystaniem metodologii powierzchni odpowiedzi, z eksperymentami zaprojektowanymi zgodnie z centralnym planem kompozycyjnym, a uzyskane wyniki posłużyły do dobrania empirycznego modelu matematycznego. W efekcie Autorka uzyskała dane wyjściowe, pozwalające zmaksymalizować ilość miejsc utlenień i co zostało zwalidowane i z sukcesem zweryfikowane eksperymentalnie. Moim zdaniem jest to szczególnie istotny element ocenianej dysertacji.

Wychodząc z założenia, że ilość wygenerowanych enzymatycznie miejsc utlenień powinien zależeć od stopnia krystaliczności, Doktorantka udowodniła, że zliofilizowane błony, po uprzedniej merceryzacji, charakteryzuje niższy indeks krystaliczności, ale też niższe wartości wiązania LPMO z powierzchnią materiału. Co ciekawe, mimo zmniejszonej sorpcji enzymu, ilość wygenerowanych miejsc utlenień była 4-krotnie większa. Stąd, słusznie, dalsze badania objęły zastosowanie błon niemodyfikowanych i merceryzowanych przed liofilizacją. Dotyczyły one oceny morfologii powierzchni (SEM), charakterystyki wprowadzonych grup funkcyjnych (FTIR-ATR), stopnia krystaliczności (XRD), degradacji w glebie łąkowej, podatności na hydrolizę z udziałem enzymów celulolitycznych oraz zdolności do adsorpcji Czerwieni Kongo. Uwzględniając właściwości użytkowe merceryzowanych błon Autorka zauważyła, że charakteryzują się mniejszą podatnością na

biodegradację i enzymatyczną hydrolizę oraz słabszą sorpcją barwnika. (Drobna uwaga. Ustawiając na Wykresie 10 ten sam zakres na osi czasu, lepiej byłoby widać uzyskane różnice w szybkości degradacji.). Stąd dalsze badania prowadzono z membraną natywną, poddaną liofilizacji i enzymatycznemu utlenieniu.

W ostatnim etapie badań Doktorantka przeprowadziła szereg eksperymentów, pozwalających oszacować możliwości aplikacyjne otrzymanego preparatu nanocelulozy, z pośrednim wskazaniem na nowatorskie systemy pakowania i przechowywania żywności. W tym celu zajęła się immobilizacją adsorpcyjną lizozymu na sfunkcjonalizowanych i natywnych błonach, rozpoczynając od dobrania warunków wiązania, a następnie potwierdziła zwiążanie enzymu analizą FTIR-ATR. Następnie wyznaczyła parametry równania Michaelisa-Menten i zbadała stabilność w warunkach przechowywania badanych preparatów. Autorka wykazała, że efektywność immobilizacji jest znacząco większa dla utlenionych błon, niż w przypadku błon natywnych, ale przy porównywalnej aktywności hydrolitycznej i stabilności. Do tej części mam kolejną uwagę. Parametry kinetyczne immobilizowanych enzymów nie są tożsame z parametrami enzymów natywnych, gdyż te pierwsze, z definicji, zawierają takie zjawiska jak opory dyfuzyjne i współczynniki podziału, a co zostało przez Autorkę znaczone w Dyskusji. Dawniej zalecano, aby te różnice podkreślać w indeksie dolnym jako wartości efektywne lub pozorne (ang.: effective, apparent; eff, app). Poza tym linearyzacja wskazuje, że może mieć miejsce inhibicja substratem, co warto sprawdzić.

Najciekawszym elementem ocenianej rozprawy są testy funkcjonalne, które objęły badania nad aktywnością przeciwbakteryjną i antyoksydacyjną. W tych przypadkach zasadność zastosowania enzymatycznego utlenienia błon jest bardzo dobrze wyrażona. Cytując Autorkę: „Niniejsze badania wskazują zatem na możliwość zastosowania kompozytów oxBNC-LYS w przemyśle spożywczym, jako aktywne opakowania lub wkładki dodawane do produktów spożywczych, mające za zadanie hamowanie wzrostu niepożądanych mikroorganizmów ...” oraz „... mogłyby przedłużyć okres przydatności do spożycia zapakowanej żywności poprzez zapobieganie i/lub spowalnianie niepożądanym procesom utleniania lipidów i białek.”

Dyskusję wyników oceniam jako wykonaną profesjonalnie, wnikliwie i nie mam żadnych zastrzeżeń. Jest to zdecydowanie najlepszy i najciekawszy element opracowania.

Część eksperymentalną kończą wnioski, dość nieszczęśliwie poszatowane na poszczególne etapy badań, jakby nie miały powiązań. W dodatku znaczna ich część to obserwacje, a nie wnioski, gdyż generują pytania „dlaczego?” i pozostawiają je bez odpowiedzi. Dla przykładu: „Obróbka termiczna bakteryjnej celulozy doprowadza do

ograniczenia dostępności jej powierzchni dla działania enzymów.” Tu nie wiadomo, jaki typ obróbki termicznej i co może być przyczyną. Kolejny wniosek: „Mechaniczna dezintegracja (homogenizacja) BNC pozwala na osiągnięcie największej wydajności enzymatycznego utleniania tego biomateriału.”, a w domyśle pozostaje większa dostępność włókien celulozowych dla enzymu. Zaskakuje też brak wniosku wynikającego z obliczeń z wykorzystaniem modelu izotermy sorpcji Langmuira, zastosowanie którego uważam za dużą zaletę tego etapu. Pominięte zostały też wyniki dotyczące wydajności oksydacji wszystkich badanych form materiału. W obu przypadkach homogenat posiadał znacznie lepsze właściwości od liofilizowanych błon. Nie jest to w ewidentnej sprzeczności z bardzo dobrze sformułowanym wnioskiem ostatnim (w tej grupie). Mam nadzieję, że większość stwierdzeń faktów zostanie zamieniona na wnioski o charakterze bardziej ogólnym w publikacji, która powinna powstać na bazie uzyskanych wyników, po połączeniu z optymalizacją warunków enzymatycznego utleniania. I tu duże zaskoczenie; Autorka zastosowała nowoczesną technikę optymalizacyjną, ale we wnioskach nie ma o tym informacji. W tej sytuacji, z samych stwierdzeń i wniosków, wynika metoda prób i błędów. W sumie ten rozdział wskazuje na duże umiejętności Doktorantki w obszarze analizy, natomiast umiejętności syntezy i formułowania wniosków należy udoskonalić.

Podsumowując recenzję chciałabym zaznaczyć, że, poza powyższymi uwagami, nie mam żadnych poważniejszych zastrzeżeń. Całościowo praca zawiera wiele interesujących wyników, w badaniach wykorzystano bogatą paletę metod analitycznych, optymalizację procesu utleniania i eksperymentalną weryfikację potencjału aplikacyjnego. Za najważniejsze osiągnięcie doktorantki uważam wykazanie, że otrzymane błony, po enzymatycznym sfunkcjonalizowaniu i zaadsorbowaniu lizozymu, mogą stanowić element opakowania, przedłużający trwałość żywności i to na dwa sposoby: hamowanie wzrostu mikroorganizmów i spowolnienie utleniania lipidów i białek. Zatem cel naukowy rozprawy, polegający na udowodnieniu, że błony nanocelulozowe mogą efektywnie zostać sfunkcjonalizowane lityczną polisacharydową monooksygenazą, został w pełni osiągnięty.

Wnioski końcowe

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską oraz z dwoma publikacjami, które powstały w czasie jej realizacji, stwierdzam, że dysertacja mgr inż. Moniki Kaczmarek, zatytułowana „Enzymatyczna funkcjonalizacja bakteryjnej nanocelulozy” spełnia z nadmiarem wymagania stawiane przez Ustawę o szkolnictwie wyższym i nauce z dn. 20 lipca 2018 r. oraz zwyczajowe kryteria, stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję zatem o jej przyjęcie i

dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania przed Radą ds. Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej. Jednocześnie, uwzględniając rozległość prowadzonych badań eksperymentalnych oraz uzyskane wyniki o charakterze naukowym i aplikacyjnym, wnioskuję o wyróżnienie dysertacji.

Walentyna Brygida

Prof. dr hab. Jolanta Bryjak
Profesor emerytowany
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska

Wrocław; 18.09.2023 r

Rada ds. Stopni Naukowych w dyscyplinach
nauki chemiczne, inżynieria chemiczna,
technologia żywności i żywienia

Politechnika Łódzka

ul. Wólczańska 171/173

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Dysertacja mgr inż. Moniki Kaczmarek, zatytułowana „Enzymatyczna funkcjonalizacja bakteryjnej nanocelulozy”, dotyczy wykorzystania mało poznanej litycznej polisacharodowej monooksygenazy do włączania w strukturę nanocelulozy reaktywnych ugrupowań chemicznych, pozwalających na jej dalsze funkcjonalizacje i poszerzające możliwości aplikacyjne materiału podstawowego. Tematyka sama w sobie jest aktualna i poszerza wiedzę na temat otrzymywania wielofunkcyjnych materiałów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka otrzymywała membrany nanocelulozowe, wykonała serie modyfikacji oraz ich podstawową charakterystykę strukturalną i funkcjonalną na poszczególnych etapach badań i wykorzystywała nowoczesne metody planowania eksperymentów. Należy również dodać, że w jej dorobku naukowym znajdują się wartościowe dwie publikacje. Dlatego uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Kaczmarek spełnia z nadmiarem wymogi stawiane tego typu dysertacjom.

