



Politechnika
Śląska



UCZELNIA
BADAWCZA
INICJATYWA DOBROCI

Wydział Chemiczny
Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii

Prof. dr hab. inż.
Anna Chrobok
Profesor

Gliwice, 23.08.2021

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Jankowskiej

pt. „*Immobilized oxidoreductases as tools for decolorization of dyes from aqueous solutions*”

Przedłożona do oceny dysertacja została wykonana przez Panią mgr inż. Katarzynę Jankowską na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Praca powstała w zespole wybitnego specjalisty Pana prof. dr hab. inż. Teofila Jesionowskiego co zagwarantowało wysoką jakość badań. Promotorem pomocniczym doktoratu był Pan dr hab. inż. Jakub Zdarta.

Podstawą wydania opinii jest pismo Pani Dziekan Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej prof. dr hab. inż. Ewy Kaczorek z dnia 12 lipca 2021 r. (RD-11/7/2021).

Tematyka podjęta w ramach pracy doktorskiej, dotycząca poszukiwań nowych układów biokatalitycznych stosowanych w usuwaniu barwników z roztworów wodnych jest ważna i pilna. Aby właściwie zarządzać zasobami wodnymi należy ściśle nadzorować ich jakość. Państwa członkowskie UE sprawdzają stan swoich wód i sporządzają plany ich oczyszczenia. Dostęp do wody dobrej jakości ma zasadnicze znaczenie zarówno dla ludności, jak i pod względem ochrony środowiska oraz gospodarki. Tak więc efektywne usuwanie zanieczyszczeń, w tym farmaceutyków, fenoli, barwników i innych niebezpiecznych zanieczyszczeń z wód gruntowych i ścieków to obecnie niezwykle aktualne wyzwanie. Tematyka ocenianej pracy dobrze wpisuje się w te trendy. Doktorantka proponuje nowatorskie formy preparatów enzymatycznych w postaci immobilizowanej oksydoreduktazy na powierzchni układów tlenkowych oraz włókien elektroprzewodzących do usuwaniu barwników z roztworów wodnych.

Politechnika Śląska

Wydział Chemiczny

Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii

ul. Krzywoustego 4, 44-100 Gliwice
+48 32 237 29 17/+48 32 237 10 32 (fax)
anna.chrobok@polsl.pl

NIP 631 020 07 36

ING Bank Śląski S.A. o/Gliwice 60 1050 1230 1000 0002 0211 3056



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Badania nad immobilizacją enzymów rozpoczęto w celu rozwiązania problemu odzyskiwania enzymów ze względu na ich wysoką cenę. Obecnie technika ta pozwala na poprawę wielu właściwości enzymów, takich jak stabilność, aktywność, selektywność, specyficzność, a nawet czystość. Immobilizacja enzymu zapewnia duże korzyści dla przebiegu bioprocessu biorąc pod uwagę sumarycznie wszystkie czynniki, w tym rodzaj nośnika i protokół immobilizacji (aktywne grupy w nośniku, warunki immobilizacji). W tym ujęciu właściwa immobilizacja enzymu pozostaje krytycznym krokiem w przemysłowym projektowaniu katalizatora enzymatycznego. Dlatego też przedstawiona w pracy tematyka jest ważna zarówno pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym. Uważam, że postawiony przez Doktorantkę ambitny cel pracy został osiągnięty na wysokim światowym poziomie naukowym.

Przedstawiona do opinii rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Pani mgr inż. Katarzyna Jankowska zawarła treść swoich badań w formie przewodnika napisanego w języku angielskim po związanych tematycznie publikacjach. W przewodniku znajdują się następujące rozdziały: dorobek naukowy, lista publikacji stanowiących cykl, abstrakt, streszczenie w języku polskim, wprowadzenie, cel pracy, opis osiągnięć, podsumowanie i dyskusja, konkluzje oraz perspektywy dalszych badań, spis literatury, kopie publikacji tworzące cykl oraz oświadczenia o współautorstwie. Przewodnik został przygotowany solidnie i przejrzysto, a bogata szata graficzna ułatwia śledzenie wyników.

Spójny tematycznie zbiór artykułów zatytułowany "*Immobilized oxidoreductases as tools for decolorization of dyes from aqueous solutions*" stanowi sześć publikacji w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF = 3,623 do 6,498), znajdujących się na wysokich pozycjach na liście MNiSW (70-140 pkt), takich jak: *Catalysts, Materials, Environmental Technology & Innovation, Process Biochemistry, Environmental Research, Bioorganic Chemistry*. Warto podkreślić, że w każdym przypadku Doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o jej dominującym wkładzie w wykonywanie badań, który jest szacowany w pięciu pracach na 50% i w jednej na 60%.

Pani mgr inż. Katarzyna Jankowska jest współautorką sumarycznie 17 publikacji, 3 rozdziałów w książkach oraz 15 wystąpień ustnych i 19 posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych. Doktorantka była/jest kierownikiem dwóch grantów NCN (PRELUDIUM i ETIUDA) oraz wykonawcą w grantzie SONATA. Została stypendystką programu NAWA „The Iwanowska Programme”. Pani mgr inż. Katarzyna Jankowska odbyła półtoraroczny staż w

Technical University of Denmark oraz trzy tygodniowe pobyty na Politechnice Warszawskiej. To mocna strona Doktorantki, gdyż odbyte staże na pewno zaowocowały zdobyciem nowych doświadczeń naukowych oraz publikacją wspólnych artykułów. Dodatkowo Pani mgr inż. Katarzyna Jankowska otrzymała stypendia rektorskie oraz stypendium dla młodych badaczy poznańskiego środowiska naukowego w 2020 roku.

Badania wykonane w ramach doktoratu są spójne, obejmowały proces wytworzenia nośników enzymów, optymalizację procesu immobilizacji enzymów, charakterystykę otrzymanych biokatalizatorów oraz ich aplikację w procesie dekoloryzacji wybranych barwników z roztworów wodnych. Doktorantka stosuje dwa rodzaje nośników oksydoreduktaz o zróżnicowanych właściwościach i morfologii: układy tlenkowe oraz włókna elektroprzędzone. Wybrane oksydoreduktazy, tj. lakaza i peroksydaza chrzanowa zostały unieruchomione na powierzchni nośników wykorzystując zarówno szybki i prosty sposób adsorpcji, jak i bardziej wymagający proces immobilizacji poprzez wiązanie kowalencyjne. Warto podkreślić, że ważnym elementem badań było określenie mechanizmu immobilizacji, co pozwoliło na lepsze zrozumienie zachodzących interakcji enzym-nośnik.

Mocną stroną pracy jest część dotycząca charakterystyki materiałów poprzez wykorzystanie analizy skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (CLSM), transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), dyfrakcji rentgenowskiej (XRD), energodispersyjnej mikroanalizy rentgenowskiej (EDS), spektrofotometrii UV-Vis (UV-Vis), jak i pomiarów potencjału dzeta.

Do badań degradacji wybrano barwniki z różnych grup, takie jak barwniki azowe, antrachinonowe i triarylometanowe. Doktorantka przedstawia dyskusję nad mechanizmem ich degradacji, co tłumaczy różnice w efektywności działania poszczególnych biokatalizatorów. Interesującym przykładem była dekoloryzacja barwników z modelowych roztworów wodnych imitujących wody morskie. Co ważne zbadano również toksyczność roztworów po procesie degradacji.

Z przyjemnością czyta się obszerny wstęp literaturowy, w którym Doktorantka systematycznie opisała oksydoreduktazy, pokazała ich zastosowanie, następnie skupiła się na lakazie i peroksydazie chrzanowej. W następnym rozdziale zawarła najważniejsze informacje dotyczące immobilizacji enzymów, z uwzględnieniem metod ich immobilizacji oraz wykorzystania unieruchomionych oksydoreduktaz w procesie dekoloryzacji barwników.

W szczególności, w publikacjach 1 i 2 przedstawiono sposób wytwarzania hybrydowych materiałów tlenkowych: $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ and $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2\text{-SiO}_2$ oraz $\text{ZrO}_2\text{-SiO}_2$. Otrzymane materiały zostały scharakteryzowane i wykorzystane do immobilizacji lakazy przez adsorpcję. Zastosowanie mieszaniny trzech tlenków jako nośnika pozwoliło na efektywniejszą adsorpcję w porównaniu do układów wykorzystujących dwa tlenki ze względu na wyższą porowatość materiału oraz obecność krzemu. Otrzymane układy charakteryzowały się wysoką aktywnością w różnych warunkach procesowych. Opracowane w publikacji 2 domieszkowanie $\text{ZrO}_2\text{-SiO}_2$ jonami miedzi poprawiło właściwości nośnika pod kątem immobilizacji lakazy i aktywności powstałego biokatalizatora.

Publikacje 3-6 skupiają się na wytwarzaniu włókien elektroprzędzonych, modyfikacji ich powierzchni i immobilizacji oksoreduktaz, również poprzez wiązanie chemiczne. Efektywność oksydoreduktazy związanej kowalencyjnie z włóknami nylonu 6 w procesie odbarwiania wodnych roztworów wybranych barwników okazała się wyższa w porównaniu z lakazą osadzoną w procesie adsorpcji (publikacja 3). Doktorantka postuluje, że może to być wynikiem lepszej stabilizacji struktury enzymu. Obydwa materiały miały podobną stabilność w czasie przechowywania. Dodatkowo wykazano, że zaadsorbowany enzym łatwiej ulega procesowi wymywania z powierzchni nośnika. Natomiast w publikacji 4 opisano elektroprzędzone włókna z nylonu 6 modyfikowane aldehydem glutarowym, które zastosowano do immobilizacji peroksydazy chrzanowej. Dla porównania zastosowano też proces prostej adsorpcji enzymu. Enzym przywiązany chemicznie do nośnika wykazał wyższą stabilność podczas przechowywania. Natomiast testy dekoloryzacji barwników z modelowego roztworu wody morskiej wykazały wyższą aktywność enzymu osadzonego adsorpcyjnie na nośniku. Elektroprzędzone włókna zostały wytworzone również z poli(metakrylanu metylu) oraz polianiliny (publikacja 5) i użyte do osadzenia lakazy. Tym razem technika adsorpcji była skuteczniejsza pozwalając na otrzymanie bardziej aktywnych biokatalizatorów. W ostatniej 6 publikacji Doktorantka zamieściła badania właściwości systemów opartych o włókna elektroprzędzone z polistyrenu/poli(D,L-laktydu-ko-glikolidu), które zostały poddane modyfikacji z wykorzystaniem (3-aminopropyl)trioksyloksyanu z aldehydem glutarowym i/lub polidopaminy. Uzyskane wyniki wskazują, że unieruchomiona na ich powierzchni lakaza charakteryzowała się wysoką stabilnością zarówno w trakcie przechowywania, jak i w kolejnych cyklach katalitycznych.

Podsumowując, Doktorantka wykazała, że aktywność i stabilność heterogenicznego biokatalizatora silnie zależy od stosowanego nośnika i mechanizmu immobilizacji enzymu, co wskazuje na dużą wagę optymalizacji tego procesu.

Istotnym elementem podsumowania jest tabela 7, z której Doktorantka umieściła porównanie efektywności usuwania niebezpiecznych związków przez biosystemy składające się z hybrydowych materiałów tlenkowych i/lub włókien elektroprzędzonych z unieruchomionymi oksydoreduktazami. Z tabeli tej jednoznacznie wynika, że opracowane w ramach pracy doktorskiej metody usuwania barwników są bardzo skuteczne. Nowatorskie biokatalizatory wykazują wyższą aktywność w porównaniu z danymi literaturowymi (efektywność procesu utrzymuje się na poziomie od 70-100%). Uważam, że wyjątkowe właściwości opracowanych układów biokatalitycznych wskazują na duży potencjał aplikacyjny tych materiałów. Uzyskane przez Panią mgr inż. Katarzynę Jankowską wyniki charakteryzuje oryginalność naukowa. Rozpoczęte badania mogą służyć za inspirację dla następnych prac, np. dotyczących usuwania innych niebezpiecznych zanieczyszczeń z roztworów wodnych.

Wszystkie publikacje stanowiące cykl zostały poddane recenzji i opublikowane w czasopiśmie z listy JCR o wysokich współczynnikach oddziaływania. Dlatego też rola recenzenta jest ograniczona i polega na wyszczególnieniu i ocenie istotnych osiągnięć naukowych. Za najważniejsze elementy naukowe recenzowanej pracy uważam:

- opracowanie efektywnych metod otrzymywania i charakterystyki różnorodnych nowatorskich materiałów tlenkowych oraz przedzonych włókien polimerowych o zdefiniowanych właściwościach;
- opracowanie efektywnych metod modyfikacji materiałów tlenkowych oraz przedzonych włókien polimerowych dedykowanych dla różnych zastosowań;
- opracowanie nowatorskich metod immobilizacji oksydoreduktaz na powierzchni materiałów tlenkowych oraz przedzonych włókien polimerowych za pomocą wiązania chemicznego enzymu do modyfikowanej powierzchni materiału oraz poprzez prostą adsorpcję enzymu;
- wyjaśnienie mechanizmów immobilizacji oksydoreduktaz na powierzchni badanych materiałów;
- otrzymanie nowatorskich, zdefiniowanych, wysoce stabilnych biokatalizatorów w procesie przechowywania oraz wysoce aktywnych w procesie usuwania barwników z roztworów wodnych;

- wyjaśnienie mechanizmów działania biokatalizatorów w procesie usuwania barwników z roztworów wodnych;
- wysoki potencjał aplikacyjny otrzymanych biokatalizatorów w innych procesach, np. usuwana niebezpiecznych zanieczyszczeń z roztworów wodnych, jak farmaceutyki czy fenole.

Podczas czytania pracy szukałam odpowiedzi na następującą kwestię:

- Które z opisanych w pracy doktorskiej biokatalizatorów mają największe szanse z punktu widzenia ekonomicznego na wykorzystanie na większą skalę w procesach przemysłowych? Które etapy limitują ogólne koszty wytwarzania proponowanych biokatalizatorów?
- Do jakich innych procesów niż oczyszczanie wodnych roztworów zanieczyszczeń mogą być w przyszłości wykorzystane nowatorskie biokatalizatory? Doktorantka sugeruje, że mogą być zastosowane w różnych dziedzinach nauki i przemysłu.
- Proszę o dyskusję różnic w aktywnościach biokatalizatorów otrzymanych poprzez przywiązanie enzymu do powierzchni nośnika oraz osadzenie metodą adsorpcji. W przedstawionych badaniach te aktywności są zróżnicowane, a Doktorantka sugeruje lepszą stabilizację struktury enzymu przywiązanego za pomocą wiązania chemicznego do powierzchni nośnika.
- Czy większe ilości enzymu unieruchomionego na powierzchni nośnika powodowały wyższą aktywność biokatalizatora?
- Jak wpływa mechanizm dekoloryzacji na zróżnicowaną aktywność biokatalizatorów?

Na podstawie oceny pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Jankowskiej pt. „*Immobilized oxidoreductases as tools for decolorization of dyes from aqueous solutions*” stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 16 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Zgodnie z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę stanowią, że przewody doktorskie, (...), wszczęte i niezakończone przed dniem wejścia w życie ustawy, o której mowa w art. 1, są przeprowadzone za zasadach dotychczasowych, z tym, że jeżeli nadanie stopnia doktora, (...), następuje po dniu 30 kwietnia 2019 r. stopień (...) nadaje się w dziedzinach i dyscyplinach kreślonych w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3tej ustawy. Tak więc wnioskuję do Rady dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Poznańskiej o przyjęcia pracy i dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy doktorskiej oraz jej aplikacyjny charakter, nowatorskie osiągnięcia, ponadprzeciętny dorobek naukowy, jak i imponujący udział w kierowaniu projektami w tak krótkim czasie prowadzenia pracy naukowej, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Chrobek