



Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej
i Biotechnologii

Dr hab. inż.
Danuta GILLNER
Prof. PŚ

Gliwice, 16.03.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Emilii Niemczyk
pt. „Ukierunkowana biosynteza i wybrane aspekty aktywności biologicznej
fikobiliprotein”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Lipoka, dotyczy badań nad fikobiliproteinami, ich wytwarzaniem i aktywnością biologiczną. Fikobiliproteiny, ze względu na zidentyfikowane właściwości użytkowe i biologiczne, wzbudziły zainteresowanie wielu gałęzi przemysłu, m.in. spożywczego czy kosmetycznego. Właściwości antyoksydacyjne, antybakteryjne czy antynowotworowe powodują, że coraz częściej uwagę kieruje się na zastosowanie fikobiliprotein w otrzymywaniu biofarmaceutyków, czy w dziedzinie diagnostyki. Ze względu na tak szerokie możliwości aplikacyjne, wiele uwagi poświęca się aspektom wydajnego otrzymywania, ekstrakcji i oczyszczania tych cennych związków. Obecnie, głównym źródłem fikobiliprotein są cyjanobakterie. Dlatego też, praca doktorska p. Emilii Niemczyk wpisuje się bardzo dobrze w nowe trendy, związane z procesami wytwarzania i określania aktywności biologicznej fikobiliprotein.

Ocena układu rozprawy

Rozprawa doktorska posiada klasyczny układ, jest podzielona na rozdziały i podrozdziały. Napisana jest poprawnie, z zachowaniem prawidłowych proporcji poszczególnych rozdziałów i liczy 190 stron (w tym wykaz skrótów, cel pracy - 2 strony, przegląd literatury - 29 stron, metodologia prowadzenia badań - 19 stron, omówienie i dyskusja wyników - 87 stron, podsumowanie - 4 strony, wnioski - 1 strona, podsumowanie w j. angielskim - 4 strony, suplement - 15 stron). Praca zawiera również opis dorobku naukowego Doktorantki oraz bibliografię. Cytowanych jest aż 336 pozycji literaturowych, w znaczącej części opublikowanych po 2000 roku. W rozprawie zamieszczono 93 rysunki i 11 tabel. Wyniki badań zostały przedstawione oraz omówione w sposób czytelny i zrozumiały.

Politechnika Śląska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii
ul. Krzywoustego 8, pok.0.08, 44-100 Gliwice
+48 32 237 2 619
Danuta.Gillner@polsl.pl

NIP 631 020 07 36
ING Bank Śląski S.A. o/Gliwice 60 1050 1230 1000 0002 0211 3056



Ocena merytoryczna

Przedstawiony temat pracy w pełni zgadza się z określonymi w rozdziale “Cel pracy” założeniami i zakresem badań oraz przedstawionymi wynikami.

Doktorantka jasno przedstawiła bardzo ambitny cel pracy, którym było określenie wpływu wybranych czynników na produkcję i aktywność biologiczną fikobiliprotein. Osiągnięcie tego celu wymagało realizacji szeregu zadań. Zakres badań jakie Autorka zrealizowała był bardzo szeroki, począwszy od oceny wrażliwości testowanych cyjanobakterii halofilnych i słodkowodnych na działanie wybranych stresorów (natężenie i barwa światła oraz modulatory chemiczne z grupy związków fosfonowych i boronowych), po określenie zmian zawartości chlorofilu i fikobiliprotein oraz zmian struktury i aktywności biologicznej. Dodatkowo, Doktorantka podjęła również badania oddziaływania fikobiliprotein z jonami złota.

W rozdziale „Przegląd literatury”, Autorka przedstawiła stan wiedzy dotyczący budowy i podziału fikobiliprotein, skupiając się najpierw na szlakach biosyntezy samych chromoforów. Następnie opisała dokładnie proces tworzenia się fikobiliprotein. Doktorantka omówiła najważniejsze enzymy (m.in. liazy), katalizujące poszczególne etapy przemian. W dalszej części, p. Niemczyk przedstawiła proces agregacji fikobiliprotein oraz podała najważniejsze właściwości utworzonych fikobilisomów. Kolejne rozdziały dostarczyły informacji na temat właściwości i szerokiego zastosowania fikobiliprotein w przemyśle spożywczym (naturalne barwniki), kosmetycznym (barwniki i przeciwutleniacze), farmaceutycznym, medycynie (m.in. w diagnostyce, terapii fotodynamicznej, terapiach przeciwnowotworowych), czy do wytwarzania nanocząstek srebra. Następnie Autorka przedyskutowała wpływ wielu czynników (barwy i natężenia światła, pH i temperatury medium hodowlanego, azotu, metali ciężkich, pestycydów, zanieczyszczeń) na produkcję fikobiliprotein w komórkach cyjanobakterii. Tę część pracy kończy omówienie metod izolacji i oczyszczania fikobiliprotein. Wstęp literaturowy oraz liczba cytowanych publikacji, świadczą o bardzo dobrym rozeznaniu p. Niemczyk w tematyce pracy i gruntownym przygotowaniu do podjęcia badań w tej dziedzinie. Świadczą również o dużych umiejętnościach Doktorantki w zakresie odpowiedniego doboru i interpretacji danych literaturowych.

Kolejnym rozdziałem jest „Metodologia prowadzonych badań” gdzie Autorka opisała stosowane gatunki cyjanobakterii, mikroalg oraz grzybów, jak również związki wykorzystywane w badaniach, po czym jasno omówiła kolejne procedury badawcze i liczne metody analityczne stosowane w pracy. Ciekawym podejściem było zebranie szczegółów dotyczących części eksperymentalnej w Suplemencie, na końcu pracy, co umożliwia szybkie znalezienie potrzebnych danych.

W części “Wyniki badań” logicznie przedstawione zostały wyniki kolejnych etapów realizacji założonych w pracy celów. Jestem pod wrażeniem tak szerokiego zakresu eksperymentów, na tak wielu organizmach. Autorka w swoich badaniach zastosowała aż 6 gatunków słodkowodnych i

3 gatunki halofilnych cyjanobakterii, 5 gatunków mikroalg eukariotycznych oraz 16 gatunków grzybów strzępkowych. Przetestowała wpływ czterech związków aminofosfonowych i czterech związków boronowych na produkcję chlorofili i fikobiliprotein w 9 gatunkach cyjanobakterii.

Doktorantka bardzo dokładnie i jasno przedstawiła na rysunkach wpływ wybranych ksenobiotyków na zawartość fikobiliprotein i chlorofili. W dyskusji omówiła m.in. wpływ stężenia poszczególnych związków oraz czasu hodowli, na wytwarzanie fikobiliprotein (fikocyjaniny, allofikocyjaniny i fikoerytryny). Za bardzo użyteczne uważam zebranie wyników wrażliwości cyjanobakterii na obecność ksenobiotyków w postaci map termicznych, co pozwala łatwo określić pozytywne i negatywne oddziaływania poszczególnych związków z wybranymi gatunkami badanych organizmów. Podsumowując wpływ każdej z grup ksenobiotyków, Doktorantka przedstawiła na jakie procesy w badanych organizmach mogą wpływać testowane związki fosfonowe i boronowe. Autorka uzasadniając dobór związków boru do badań, powołuje się na rosnące zainteresowanie tą grupą, przytaczając m.in. przykład, że „metabolity i koniugaty tawaborolu, są wydalane głównie z moczem”. Moim zdaniem otwiera to kolejną ścieżkę badawczą, gdyż ciekawe byłoby sprawdzenie wpływu metabolitów badanych modulatorów na wzrost cyjanobakterii i produkcję fikobiliprotein. W środowisku naturalnym występują przecież nie tylko badane w pracy związki, ale również produkty ich rozpadu, czy metabolizmu w różnych organizmach żywych.

Pewien niedosyt budzi jedynie fakt, że mimo przedstawienia na wykresach zawartości poszczególnych fikobiliprotein (fikocyjaniny, fikoerytryny i allofikocyjaniny), Autorka w dyskusji prawie cały czas odnosi się tylko do ich sumy. Trochę zabrakło mi chociaż krótkiej dyskusji dotyczącej zróżnicowanych ilości poszczególnych typów fikobiliprotein, wytwarzanych przez badane gatunki cyjanobakterii oraz zmian spowodowanych stosowanymi związkami chemicznymi.

Kolejna część badań, już na wybranym gatunku halofilnych sinic *Arthrospira platensis*, dotyczyła określenia wpływu testowanych związków chemicznych na procesy energetyczne zachodzące w tym organizmie. Doktorantka wyznaczyła zawartości ATP, ADP i AMP w komórkach cyjanobakterii oraz obliczyła adenylowany ładunek energetyczny. Dodatkowo Autorka określiła również skład i czystość fikobiliprotein wyekstrahowanych z komórek *Arthrospira platensis* oraz zmiany w drugorzędowej strukturze białek zawartych w ekstraktach.

Za wartościowe, z punktu widzenia technologicznego i aplikacyjnego, uważam badania prowadzone w większej skali, w fotobioreaktorze o pojemności całkowitej 4 L. Uzyskane dla wybranych modulatorów chemicznych wyniki potwierdziły korzystny wpływ tych substancji na produkcję fikobiliprotein oraz możliwość zwiększenia skali hodowli. Dodatkowo doktorantka udowodniła, że kluczowe znaczenie w procesie wytwarzania fikobiliprotein ma barwa światła, a przy zastosowaniu światła niebieskiego i mieszanego (czerwone, a później niebieskie) zaobserwowała

wzrost ilości wytwarzanych barwnych białek. W tej części znajduje się też rzetelna dyskusja dotycząca wpływu barwy światła na produkcję poszczególnych typów fikobiliprotein.

Omówienie wyników kończy opis badań aktywności biologicznej fikobiliprotein, wyizolowanych z *Arthrospira platensis*. Doktorantka zauważyła m.in. niewielki wpływ ekstraktów fikobiliproteinowych na rozwój słodkowodnych cyjanobakterii oraz bardziej znaczący dla mikroalg eukariotycznych. Zbadała również aktywność przeciwgrzybiczą otrzymanych fikobiliprotein. Mimo, że w większości przypadków badane proteiny nie wykazywały aktywności w stosunku do grzybów strzępkowych, to obserwacje dotyczące grzybów *Trichoderma koningii* mogą być przydatne w opracowywaniu nowych preparatów biologicznej ochrony roślin. Doktorantka wykazała również, że badane fikobiliproteiny mogą redukować jony złota Au^{3+} .

Najważniejsze aspekty pracy zostały na koniec krótko i jasno przedstawione w „Podsumowaniu” (w j. polskim i angielskim), a najbardziej istotne wnioski ujęte w 11 punktach.

Strona merytoryczna pracy nie budzi zastrzeżeń, jednak przy tego typu opracowaniach nieuniknione są pewne niedopatrzania oraz błędy edytorskie i językowe, które w niewielkim stopniu wpływają na moją ostateczną ocenę pracy. Z obowiązku recenzenta podaję wybrane uwagi oraz nieścisłości, które zauważyłam podczas analizy rozprawy, z prośbą o komentarz:

1. Str.44 – zgodnie z opisem, związki boronowe rozpuszczane były w DMSO, dlatego prowadzono również kontrolne hodowle cyjanobakterii z DMSO. Wyniki takich prób są podane w rozdziale 4.3, natomiast nie znalazłam podobnych informacji w przypadku badań opisanych w rozdziale 4.2. Proszę o komentarz.
2. Str.44 – nie znalazłam uzasadnienia doboru różnych zakresów stężeń związków fosfonowych i boronowych stosowanych w hodowli słodkowodnych i halofilnych gatunków cyjanobakterii?
3. W pracy wprowadzony został parametr „specyficzna zawartość/wydajność fikobiliprotein w komórkach” (Y_{PBP}). Moim zdaniem parametr ten (zdefiniowany w części doświadczalnej str. 47) nie zawsze oddaje rzeczywisty wpływ czynnika zewnętrznego na produkcję fikobiliprotein. Często, mimo znacznego obniżenia ilości wytwarzanych fikobiliprotein (PBP) i chlorofili (CHL), Autorka otrzymuje bardzo wysokie wartości Y_{PBP} , ze względu na zmianę stosunku stężenia PBP/CHL. Przykładowo na str.68, rys.26A – dla *Arthrospira fusiformis*, przy stężeniu 3mM glifozyny, po 7 dniu, Y_{PBP} wynosi 407%, po 10 dniu 163% a po 14 dniu 241%. Wskazywałoby to na intensyfikację produkcji fikobiliprotein pod wpływem glifozyny, a tymczasem po 10 i 14 dniu, stężenia fikobiliprotein i chlorofili są w tym przypadku bliskie 0. Proszę o komentarz.
4. Na rysunkach brak jest słupków błędów. Autorka zapewnia przy każdym wykresie, że wyniki są średnią z co najmniej 3 powtórzeń, jednak słupki błędów pozwoliłyby lepiej ocenić jakie były odchylenia od wartości średniej. Poza tym, w przypadku rysunków, gdzie występują części A, B, C, często brak stosownych opisów w tytułach pod wykresami, co utrudnia interpretację.

5. Str.69. Zdanie „Wzmożoną wydajność produkcji fikobiliprotein w ostatnim dniu hodowli odnotowano w przypadku słodkowodnego gatunku *Chroococidiopsis thermalis*, gdy stężenie glifozyny wynosiło 0,03 mM oraz 0,10 mM.” nie zgadza się z wykresem, gdzie w przypadku użycia 0,03 mM glifozyny, wyniki nie różnią się niczym od kontroli.
6. Str 52 i 115 określanie czystości fikocyjaniny na podstawie ilorazu absorbancji przy długościach fali 615 i 280 nm jest pewnym uproszczeniem. Niejasne jest np. co oznaczają czystości 2,36; 3,33 itp. (Tab. 7). Bardziej poprawne byłyby moim zdaniem wartości obliczone na podstawie ilorazu ilości fikocyjaniny do wyznaczonej całkowitej ilości białka w preparacie.

Wybrane błędy, w tym edytorskie i skróty myślowe (nie wymagają komentarza Doktorantki):

1. W części literaturowej, przy tytułach niektórych rysunków brak źródeł literaturowych na podstawie których je sporządzono.
2. Doktorantka czasami używa nazw zwyczajowych lub handlowych związków chemicznych, bez podania wzoru czy nazwy systematycznej (np. paration metylowy; Trolox).
3. Str. 12. Niezbyt precyzyjne określenie „Zewnętrzne pierścienie pirolowe (A i D) związane są z atomem tlenu, natomiast środkowe z resztami kwasu propionowego”.
4. Niektóre skróty używane w pracy nie są wyjaśnione w spisie skrótów (przykładowo na str.19-20).
5. Rysunki 2,4,6 – brak wyjaśnienia, co oznacza R we wzorach.
6. Str. 17 rys. 6. Nieśpójność w oznaczeniu pierścieni pirolowych (w tekście pierścienie A i D są dyskutowane jako „zewnętrzne”, natomiast na rysunku są to pierścienie A i B).
7. Niezbyt jasne zdania: Str.26 „W warunkach oświetlenia, elektrony, które zmieniają poziom energetyczny, mogą również redukować AgNO_3 w ośrodku, tworząc nanocząstki srebra... Udowodniono jednak, że fikocyjanina kieruje przeniesienie elektronu w układzie eksperymentalnym oraz jest zdolna do wiązania się z jonami metali przejściowych”.
8. Str. 46 – brak wyjaśnienia co oznaczają współczynniki liczbowe we wzorach 7-9 i 11.
9. Str. 106, brak wyjaśnienia haseł „enzymy typu-R” oraz „równowaga R-U”.

Wnioski końcowe

Podsumowując, w przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej omówione zostały aktualne zagadnienia, zarówno z punktu widzenia naukowego, jak i praktycznego. Zakres podjętych badań jest bardzo obszerny, a rozprawa zawiera wiele cennych wyników nad możliwością kontrolowanego wytwarzania fikobiliprotein przez cyjanobakterie halofilne i słodkowodne. Doktorantka udowodniła możliwość zwiększenia skali hodowli tych organizmów oraz wykonała wiele badań różnorodnej aktywności biologicznej otrzymanych białek. Pani Emilia Niemczyk wykazała się niezwykłą pracowitością oraz umiejętnościami w wykorzystaniu i analizie danych literaturowych, logicznym

planowaniu doświadczeń, ich realizacji i formułowaniu wniosków. Zastosowane w pracy liczne, nowoczesne techniki laboratoryjne i analityczne, świadczą o dużym zaangażowaniu i dobrym przygotowaniu mgr Emilii Niemczyk do pracy naukowej. Dorobek naukowy związany z tematyką pracy obejmuje 3 publikacje z listy JCR (Doktorantka jest pierwszym Autorem w jednej z nich), o łącznym IF 13,51 oraz 4 rozdziały w monografiach. Swoje wyniki Autorka prezentowała na 22 konferencjach krajowych i międzynarodowych, w postaci wystąpień ustnych i posterów. Pani Emilia Niemczyk może się także pochwalić udziałem w 3 projektach naukowych, stażem zagranicznym na Uniwersytecie w Ferrarze oraz szeroką działalnością popularyzatorską i organizacyjną. Za swoje osiągnięcia otrzymała Nagrodę Rektora Uniwersytetu Opolskiego oraz liczne stypendia w czasie realizacji pracy doktorskiej.

Uważam, że rozprawa doktorska pt. „Ukierunkowana biosynteza i wybrane aspekty aktywności biologicznej fikobiliprotein” spełnia wszystkie wymogi merytoryczne i formalne określone w art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.), w związku z czym zwracam się do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego, z prośbą o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Emilii Niemczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Danuta Gilber