



Wrocław, 2013-09-19

Dr hab. Piotr Stefanowicz

tel. 71 375 7213

piotr.stefanowicz@chem.uni.wroc.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Janka

pt. "Izolacja, identyfikacja oraz charakterystyka właściwości biomedycznych biosurfaktantów"

Pan Mgr Tomasz Janek wykonał pracę doktorską zatytułowaną: „Izolacja, identyfikacja oraz charakterystyka właściwości biomedycznych biosurfaktantów” pod kierunkiem promotora dra hab. inż. Marcina Łukaszewicza na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Przedłożona rozprawa dotyczy wyodrębnienia identyfikacji oraz zbadania właściwości biomedycznych biosurfaktantów produkowanych przez bakterie arktyczne wyizolowane ze środowiska glebowo-wodnego pochodzącego ze Spitzbergenu. W badaniach wykorzystano trzy szczepy bakterii: *Pseudomonas fluorescens* BD5, *Pseudomonas putida* BD2 oraz *Rhodococcus fascinas* BD8.

Prace te są kontynuacją projektów prowadzonych przez Zespół dra hab. inż. Marcina Łukaszewicza i są niezwykle aktualne ze względu na potencjalne wykorzystanie biosurfaktantów w wielu dziedzinach przemysłu jako bezpieczniejszych alternatyw dla toksycznych i nie ulegających biodegradacji środków powierzchniowo czynnych. Właściwości te mogą mieć znaczenie zwłaszcza kiedy środki powierzchniowo czynne są stosowane w stosunkowo dużych ilościach i nie jest możliwe pełne odizolowanie ich od środowiska, jak to ma miejsce przy ich zastosowaniu do ograniczania skutków skażenia węglowodorami ropopochodnymi czy też przy pozyskiwaniu ropy naftowej z piasków roponośnych. Atrakcyjne również wydają się terapeutyczne zastosowania biosurfaktantów jako czynników zwalczających drobnoustroje jak również hamujących tworzenie biofilmów.

Zainteresowanie tego typu substancjami na świecie jest znaczne, co znajduje swoje odzwierciedlenie w piśmiennictwie naukowym (250 publikacji rocznie, indeks h dla hasła „biosurfactant” wynosi 100).

Ocena pracy

Praca liczy 194 strony i napisana została językiem jasnym i zrozumiałym. Starannie wykonane schematy ułatwiają lekturę. Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami pracy są dobrze wyważone a całość napisana jest przejrzysto. Cele pracy są jasno sprecyzowane a wspólnym mianownikiem jest tutaj poszukiwanie nowych substancji powierzchniowo czynnych oraz zbadanie ich właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej. Część teoretyczna obejmuje 36 stron i w zwięzły sposób omawia charakterystykę, klasyfikację, szlaki biosyntezy oraz właściwości naturalnych substancji powierzchniowo czynnych. W części przeglądowej omówione zostały także metody izolowania biosurfaktantów, podstawowe metody badania ich struktury oraz przykładowe zastosowania. Pośród wymienionych metod, znalazły się metody chromatograficzne, spektrometria mas, spektroskopia w podczerwieni oraz magnetyczny rezonans jądrowy. W części tej zabrakło natomiast metod chemicznych, takich jak np. hydroliza. Może to dziwić ponieważ w części eksperymentalnej metody chemiczne dostarczyły znaczącej części informacji zastosowanej przez Autora do identyfikacji wydzielonych przez Niego substancji.

Część eksperymentalna opisana jest szczegółowo i zawiera wszystkie dane niezbędne do odtworzenia wykonanych eksperymentów. Przeprowadzone badania w pierwszym etapie obejmowały wybór szczepów bakteryjnych, określenie ich przynależności taksonomicznej przeprowadzone technikami identyfikacji genetycznej, oraz charakterystykę biochemiczną. Zastosowane metody nie pozostawiają wątpliwości co do poprawności identyfikacji badanych drobnoustrojów jednak pewien niedosyt pozostawia uzasadnienie wyboru do dalszej części badań szczepów bakteryjnych. Nasuwa się pytanie jaką część dostępnego materiału badawczego stanowiły wybrane szczepy i co zdecydowało, że właśnie one stały się obiektem późniejszych eksperymentów.

Kolejną fazą badań było opracowanie technik hodowli drobnoustrojów oraz takie dostosowanie warunków biosyntezy, aby zoptymalizować poziom produkcji biosurfaktantów. Parametrem, który pozwalał monitorować zawartość surfaktantów w roztworze pochodzonym było napięcie powierzchniowe. Pozwoliło to na dobranie warunków fermentacji zapewniających maksymalną wydajność i zdecydowanie w którym momencie proces ten powinien zostać przerwany. Następnie została przeprowadzona izolacja i oczyszczanie uzyskanych produktów fermentacji. Substancje aktywne powierzchniowo były wydzielane z mieszaniny pofermentacyjnej przez ekstrakcję (octanem etylu lub eterem t-butyłowometylowym) i zagęszczane przez odparowanie rozpuszczalnika pod obniżonym ciśnieniem. Uzyskany w ten sposób materiał poddawano wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Frakcje zawierające biosurfaktanty zostały zidentyfikowane na podstawie ich zdolności do obniżania napięcia powierzchniowego.

Wydzielone biosurfaktanty zidentyfikowano z wykorzystaniem technik chromatograficznych, chemicznych oraz spektrometrii mas.

Materiał produkowany przez *Pseudomonas fluorescens* zawierał dwa biosurfaktanty o charakterze lipopeptydów (określane jako pseudofaktyna I i pseudofaktyna II). Odkrycie tych substancji jest jednym z najciekawszych wyników ocenianej pracy doktorskiej, ponieważ struktura tych związków odbiega zasadniczo od znanych do tej pory lipopeptydów. Lipofilowa część pseudofaktyny zawiera kwas palmitynowy, podczas gdy opisane w literaturze lipopeptydy np. surfaktyny zawierają hydroksykwas alifatyczne. Budowa pseudofaktyny została ustalona na podstawie informacji pochodzących z połączenia metod chemicznych i spektrometrii mas. Hydroliza kwaśna w połączeniu z chromatografią pozwoliła zidentyfikować aminokwasy oraz kwas palmitynowy wchodzące w skład lipopeptydu. Sekwencja została ustalona na podstawie eksperymentów MS/MS. To podejście nie daje możliwości określenia konfiguracji poszczególnych reszt aminokwasowych, z czego Autor zdaje sobie sprawę i porusza ten problem w Dyskusji. Moją wątpliwość budzi natomiast odróżnienie w sekwencji pseudolaktyn reszt Leu i Ile. Te aminokwasy będące izomerami nie dają się zróżnicować w standardowych eksperymentach MS/MS. Dane chromatograficzne przedstawione na Rys. 27 mogłyby jednoznacznie rozstrzygnąć ten problem, jednak wśród zastosowanych wzorców aminokwasów brakuje Ile. Pozostawia to wątpliwość, czy w zastosowanych warunkach chromatograficznych możliwy jest rozdział Leu i Ile. Ustalenie czy w badanym peptydzie występują reszty leucyny czy też izoleucyny powinno być możliwe również na podstawie analizy widm NMR, jednak zamieszczona w ocenianej pracy doktorskiej interpretacja danych spektralnych nie odnosi się do tego zagadnienia. Innym problemem, który wymagałby przedyskutowania, jest pozytywny wynik wybarwienia pseudofaktyny ninhydriną. Reakcja ninhydrinowa wykrywa wolne grupy aminowe, które, zgodnie z przedstawioną strukturą nie występują w cząsteczce pseudosurfaktyny. Dodatkowo potwierdzają to widma ESI, w których dominują piki $[MNa]^+$ nie zaś, jak to bywa w przypadku ulegających łatwej protonacji peptydów z grupami $-NH_2$, $[MH]^+$ lub $[MH_2]^{2+}$. Detekcja homodetycznych peptydów cyklicznych nie zawierających grup aminowych zazwyczaj wymaga inkubacji rozwiniętego chromatografu z gazowym HCl, aby spowodować hydrolizę wiązań peptydowych. Pozostałe, wykryte w materiale biologicznym biosurfaktanty miały struktury odpowiadające substancjom opisanym już wcześniej w literaturze. Uprościło to w znacznym stopniu identyfikację przeprowadzoną techniką MS/MS (*Pseudomonas putida*) oraz łącząc technikę MS/MS z chromatografią cienkowarstwową poprzedzoną hydrolizą (*Rhodococcus fascians*).

Wszystkie wydzielone biosurfaktanty wydzielone z drobnoustrojów arktycznych zostały wszechstronnie scharakteryzowane. Szczegółowo zbadano ich właściwości fizykochemiczne jak również działanie biologiczne. Badane substancje silnie obniżały napięcie powierzchniowe roztworów wodnych. Najskuteczniejszy pod tym względem okazał się ramnolipid (31,0 mN/m),

któremu tylko nieznacznie ustępowała pseudofaktyna II (31,5 mN/m). Badane substancje okazały się również efektywnymi emulgatorami i wykazywały zdolność do zwilżania szkła oraz tworzyw sztucznych. Badania biologiczne były prowadzone w trzech kierunkach: oceniono ich właściwości przeciwbakteryjne, zdolność do hamowania adhezji drobnoustrojów chorobotwórczych i hamowania tworzenia przez nie biofilmów a także wpływ na komórki nowotworowe. Interesującą obserwacją było szerokie spektrum aktywności pseudofaktyny II, która łączyła działanie hamujące powstawanie biofilmów, cytotoksyczność w stosunku do linii komórek nowotworowych oraz działanie antyproliferacyjne.

Pomimo starannej przeważnie redakcji w pracy występuje kilka drobnych uchybień formalnych i językowych :

Str. 25 *cząsteczek kwasu β -hydroksylowego* - powinno być β -hydroksy kwasu

Str. 20 *W cząsteczkach biosurfaktantów część hydrofobowa stanowi zazwyczaj długi łańcuch węglowy (element kwasu tłuszczowego)* oraz jonowa lub niejonowa grupa hydrofilowa - brakuje fragmentu zdania

Str. 10 *skład kwasu tłuszczowego oraz ilości i konfigurację aminokwasów* - należy mówić raczej o liczbie aminokwasów

Str. 61 *nanosząc 10 ul inokulum* - zapewne 10 μ

Str. 158 *sekwencje pseudofaktyń przedstawione jako peptydy liniowe* - należy zaznaczyć położenie mostka estrowego łączącego grupę hydroksylową i karboksylową

Str. 73 *Zagadnieniem, które należy wykonać w przyszłości jest analiza konformacyjna aminokwasów budujących część hydrofilową pseudofaktyny I i II* - z kontekstu wynika, że tym nierozwiązanym problemem jest określenie konfiguracji optycznej, nie zaś konformacji reszt aminokwasowych.

Literatura cytowana w sposób jednolity i konsekwentny, jednak cytowanie danych internetowych wymaga oprócz adresu strony WWW podania także daty dostępu (ponieważ zawartość stron WWW może ulegać zmianom).

Jak widać na podanych przykładach są to drobne błędy które w najmniejszym stopniu nie mogą wpływać na ocenę merytoryczną przedstawionej pracy. Wykonane badania odpowiadają na pytania postawione w celu pracy. Eksperymenty zostały zaprojektowane i wykonane starannie oraz przedstawione w przejrzysty sposób. Wyniki uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej opublikowano w formie czterech prac. Należy odnotować, że doktorant jest pierwszym autorem w tych wszystkich publikacjach. Sumaryczny współczynnik wpływu publikacji związanych z ocenianą

praca doktorską jest wysoki i wynosi 13,49. Dodatkowo wyniki przedstawiono w siedmiu wystąpieniach konferencyjnych w tym także na konferencjach międzynarodowych.

Stwierdzam, że wykonana przez Mgr Tomasza Janka i przedłożona mi do recenzji praca pt. "Izolacja, identyfikacja oraz charakterystyka właściwości biomedycznych biosurfaktantów", którą oceniam bardzo wysoko, spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określone przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 18 marca 2011 jak również wymogi zwyczajowe. Dlatego wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, ze względu na poziom naukowy pracy i dorobek naukowy Doktoranta wnoszę o jej wyróżnienie

Dr hab. Piotr Stefanowicz

