

Kraków, 16 sierpnia, 2021 r.

Prof. dr hab. inż. Zbigniew Adamczyk
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN im. Jerzego Habera
ul. Niezapominajek 8
30-239 Kraków

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Król-Górniak, zatytułowanej:
Nanokompozyty metal-białko: synteza, charakterystyka oraz zastosowanie

1. Analiza formalna rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr Anny Król-Górniak wykonana została na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a funkcję promotora pełnił prof. dr hab. Bogusław Buszewski.

Rozprawa jest oparta na cyklu sześciu publikacji: jednej pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Advances in Colloid and Interface Science* w roku 2017 oraz pięciu oryginalnych prac, które ukazały się w latach 2011-2018 w czasopismach z listy JCR o wskaźniku cytowania w zakresie od 1,6 (*Phytochemistry Letters*, 2019) do 6,2 (*Applied Surface Science*, 2021). Na tej podstawie można wnioskować, że są to czasopisma o dobrym poziomie naukowym, w dziedzinie badań objętej rozprawą doktorską. Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy są wieloautorskie (sumarycznie pojawia się w nich 12 autorów) przy czym doktorantka była pierwszym autorem w czterech pracach, natomiast nie była w żadnej z nich autorem korespondencyjnym. Według oświadczenia doktorantki, wspólnego dla wszystkich prac, jej wkład polegał na: *dyskusji ogólnej koncepcji pracy, zaplanowaniu i realizacji doświadczeń, analizie i interpretacji wyników, przygotowania wstępnych wersji*

manuskryptów.

Zważywszy na bardzo znaczący dorobek doktorantki, obejmujący 14 publikacji w czasopismach o wysokim wskaźniku cytowania, oraz dwa zgłoszenia patentowe, przedstawienie rozprawy doktorskiej w formie zbioru wybranych publikacji nie było najbardziej odpowiednim pomysłem, ze względu na trudności w określeniu wkładu intelektualnego doktorantki. Z tego względu znacznie lepszy efekt naukowy i dydaktyczny miałoby przedstawienie rozprawy w formie klasycznej tzn. obszernego przeglądu literaturowego, tezy pracy i opisu badań własnych.

W obecnej formie rozprawy opis wyników przedstawionych w cyklu publikacji jest obszerny, obejmując 45 stron i 5 schematycznych rysunków, składając się z następujących rozdziałów: 1. Wprowadzenie, 2. Cel Badawczy Pracy, 3. Problem Badawczy i Bibliografia, 4. Publikacje Naukowe (kopie artykułów), 5. Podsumowanie i Wnioski oraz 6. Streszczenie.

Aczkolwiek forma dysertacji nie budzi większych zastrzeżeń, z obowiązku recenzenta należy wspomnieć o pewnych słabościach pracy, głównie natury technicznej, szczególnie o wielu nieściśłych sformułowaniach. Wymienię jedynie niektóre z nich, które pojawiają się najczęściej:

strona 1, tytuł rozprawy: *Nanokompozyty metal-białka: synteza, charakterystyka oraz zastosowanie*,

pierwsza część tytułu jest zbyt ogólnie sformułowana, prace dotyczą głównie tlenków lub kompleksów cynku, a nie metali w postaci litych, podobnie zamiast hasła białka należało napisać cząsteczki owaloalbuminy.

strona 7: *Cynk jest jednym z najważniejszych i niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania mikroelementów*,

cynk nie jest mikroelementem lecz pierwiastkiem.

str. 11 ... *potencjał zeta określa się jako potencjał elektrokinetyczny na granicy faz między jonami warstwy adsorpcyjnej a swobodnymi przeciwnymi warstewki dyfuzyjnej...*

potencjał zeta jest potencjałem elektrycznym w płaszczyźnie ścinania (shear plane) na której przepływ hydrodynamiczny ośrodka (cieczy) zanika.

str. 12, dyskusja stabilności suspensji. Potencjał zeta nie jest jedynym parametrem określającym stabilność układów koloidalnych jak to sugeruje autorka. Na stabilność wpływają bowiem rozmiar i kształt cząstek, siła jonowa elektrolitu oraz stała Hamakera określająca znaczenie oddziaływań van der Waalsa i wiele innych parametrów. Np. dla sugerowanej przez autorkę wartości potencjału zeta zapewniającego stabilność tj. 30 mV, suspensje cząstek o rozmiarach poniżej 100 nm będą niestabilne dla siły jonowej powyżej 0.05 M.

Rys. 2 przedstawiający cząsteczkę koloidu jest niezbyt precyzyjny min. w podpisie powinno być: zmiana potencjału **elektrycznego**, a nie potencjału *powierzchniowego*, który ma wartość stałą. Ponadto, potencjał zeta powinien być zaznaczony na granicy warstwy adsorpcyjnej i dyfuzyjnej, zanik potencjału w warstwie dyfuzyjnej jest eksponencjalny, a nie liniowy. Równanie Smoluchowskiego stosuje się dla wartości parametru $\kappa a > 10$, a więc dla cząstek o wielkości powyżej 100 nm, dla mniejszych cząstek lepszym przybliżeniem jest równanie Henryego.

str. 13 ... *stwierdzono, że nanokompozyty o najmniejszych rozmiarach 266,45 +/- 32 nm otrzymano w zakresie pH 4-7,*

zgodnie z definicją, nanocząstki mają rozmiary poniżej 100 nm. Prawidłowy zapis tego pomiaru (obarczonego ponad błędem 10%) to 270 +/- 30 nm.

str 19. Praca [P5] ... powinno być praca [P6]

str 23. Praca [P3] ... powinno być praca [P4]

str. 29. ... *sorpcja cynku do białka, ...dane liczbowe zostały wymodelowane dla modelu Webera-Morisa,*

nieściśle i niegramatyczne określenia.

str. 30. *Dlatego też, biorąc pod uwagę dane pochodzące ze wszystkich komplementarnych do siebie analiz, postulowany jest nowy, nieopisany do tej pory w literaturze, mechanizm formowania się Nano-ZnO na drodze syntezy biologicznej*

komplementarny jest zawsze do siebie, autorka nie dokończyła zdania i nie napisała na czym polega ten nowy mechanizm.

Jeżeli chodzi o rozdział 5. Podsumowanie i Wnioski, tu również można znaleźć szereg drobnych potknięć stylistycznych min.: *całe komórki szczepu probiotycznego, specyficzny depozyt organiczny, potencjał przeciwbakteryjny, przekształcenie jonów metali w katalityczne układy białkowe*, itp.

2. Analiza merytoryczna rozprawy.

Doktorantka główny cel swoich badań definiuje ogólnie jako: *określenie mechanizmów formowania (się) nanokompozytów tlenku cynku w wyniku wiązania jonów cynku w układach biokoloidalnych: białek bakteryjnych, roślinnych lub białek o znaczeniu przemysłowym*. Nie została jednak sformułowana teza pracy, definiująca elementy oryginalności naukowej pracy, co jest istotne zważywszy na wielką ilość doniesień literaturowych obejmujących wszystkie kluczowe aspekty syntezy i zastosowań nanocząstek tlenku cynku.

Jak wspomniano powyżej, pierwszy artykuł stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, jest obszerną pracą przeglądową. Trzy z czterech następnych prac opublikowanych w latach 2018-2020 dotyczą różnych aspektów syntezy i charakterystyki fizykochemicznej nanokompozytów tlenku cynku. Natomiast jedna z tych prac (oznaczona jako [P3]) opisuje oddziaływania dwuwartościowych kationów metali ze szczepem bakterii mlekowych, co prowadzi do ich aglomeracji. Istotne znaczenie ma szósta praca opublikowana w roku 2021, dotycząca oddziaływań jonów cynku dwuwartościowego z cząsteczkami owoalbuminy co prowadzi do tworzenia złożonych nanocząstek zawierających tlenek cynku.

Przechodząc do bardziej szczegółowej analizy, w pracy [P2] przeprowadzono badania kinetyki tworzenia cząstek tlenku cynku przy użyciu szczepu bakterii mlekowych (*Lactobacillus paracasei*) stosując jako prekursor $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Otrzymany tlenek cynku w postaci makroskopowego osadu charakteryzowano przy pomocy metod FTIR, SEM, dyfrakcji rentgenowskiej, spektrofotometrii, mikroskopii fluorescencyjnej (aktywność antybakteryjna) oraz DLS i LDV (elektroforeza). Dwustopniową kinetykę tworzenia osadu interpretowano używając modelu Webera-Morrisona. Zaobserwowano ciekawy, acz bardzo nietypowy efekt zmniejszenia wielkości cząstek od ok 3000 do 1500 nm po

1000 min. trwania reakcji. Bardzo znaczny rozmiar cząstek ZnO interpretowano jako efekt tworzenia się osadu organicznego na ich powierzchni, co prawdopodobnie powodowało zmniejszenie absolutnej wartości ich potencjału zeta od -25 mV po 100 min do -5 mV po czasie 14000 min. Na podstawie badań FTIR zaproponowano mechanizm tworzenia cząstek ZnO polegający na redukcji tzw. aqua-kompleksów cynku przez grupy amidowe i karboksylowe pochodzące głównie z białek bakteryjnych. Obszerne badania przeprowadzone przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej wykazały znaczący efekt bakteriostatyczny wobec szczepów bakteryjnych Gram(+) oraz Gram(-).

Badania przeprowadzone w pracy [P3] dotyczyły określenia oddziaływania dwuwartościowych kationów cynku, miedzi i magnezu (stężenie roztworu elektrolitów 0.01 M) ze szczepem bakterii *Lactobacillus paracasei* przy pomocy elektroforezy kapilarnej, mikroskopii fluorescencyjnej, FTIR oraz MALDI-TOF/MS. Wykazano, że modyfikacja jonami cynku i miedzi prowadzi do tworzenia aglomeratów bakterii o luźnej strukturze wskutek oddziaływań z grupami amidowymi wchodzącymi w skład białek powierzchniowych. Z kolei jony magnezowe wykazywały znaczne powinowactwo do grup karboksylowych co zapewniały tworzenie agregatów o bardziej kontrolowanej strukturze, umożliwiając ich łatwiejszą separację. Przeprowadzono również obliczenia energii wiązania jonów przy użyciu metody DFT. Dla dwuwartościowych kationów magnezu energia ta osiągała wartość -310,3 kJ/mol, typową dla wiązań chemicznych, co interpretowano jako efekt oddziaływań elektrostatycznych kationu z czterema grupami karboksylowymi. W obliczeniach tych nie uwzględniono jednak silnej hydratacji kationów magnezu, co znacząco wpływa na energię wiązania.

W pracy [P4] przeprowadzono syntezę cząstek tlenku cynku w postaci zaglomerowanego osadu przy użyciu ekstrakty z lucerny siewnej używając jako prekursor roztwór $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Wielkość krystalitów ZnO wyznaczona z równania Scherrera wynosiła 14 nm. Wykazano, że dla pH poniżej 3 i powyżej 7 suspensje cząstek w roztworach wodnych były niestabilne, co korelowało z wartością potencjału zeta w zakresie -3,5 do -5,5 mV. Stabilne suspensje o średniej wielkości cząstek 270 nm uzyskiwano dla zakresu pH 4-7, gdy potencjał zeta wyniósł -28 mV. Na podstawie analizy FTIR zaproponowano nowy mechanizm tworzenia tlenku cynku

polegający na oddziaływaniu hydratyzowanych jonów cynku (nazywanych przez autorkę aquakompleksami) ze zdysocjowanymi grupami karboksylowymi białek lucerny. Wykazano też skuteczność syntezowanych preparatów ZnO wobec mikroorganizmu *Staphylococcus epidermidis* gdzie parametr MIC osiągał zaskakująco małą wartość 0.58 mg L^{-1} podczas gdy dla chemicznie syntezowanego tlenku cynku (Sigma-Aldrich) był znacznie większy, wynosząc 2.33 mg L^{-1} .

Analogiczną syntezę cząstek tlenku cynku w postaci osadu przeprowadzono w pracy [P5] przy użyciu przesączu uzyskanego z hodowli szczepu bakterii *Lactobacillus paracasei*, używając jako prekursora roztwór $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Wykazano, że dla zakresu pH 7-9 potencjał zeta suspensji wynosił -29 mV , co interpretowano jako wskaźnik ich stabilności. Na podstawie wyników pomiarów przeprowadzonych przy pomocy metod FTIR oraz LDI-MS wykazano obecność na powierzchni cząstek ZnO warstewki związków organicznych, głównie trzech aminokwasów fenyloalaniny, kwasu asparaginowego i izoleucyny. Określono również działanie antybakteryjne syntezowanych preparatów wobec czterech szczepów, dla których parametr MIC wynosił od 86 (*Staphylococcus Aureus*) do 172 mg L^{-1} (*Escherichia Coli*).

Obszerna praca [P6] dotyczyła mechanizmów oddziaływań kationów cynku pochodzących z prekursora $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ z cząsteczkami owoalbuminy (OWA). Przeprowadzono unikatowe badania kinetyki tego procesu stosując metodę ubytku stężenia (pomiar stężenia cynku metodą FAAS) dla pH 4,5 (punkt izoelektryczny OWA), gdy występuje agregacja białka. Wyniki pomiarów analizowane przy użyciu modelu Webera-Morrisa, uwzględniając zarówno adsorpcję na powierzchni cząsteczek białka kontrolowaną przez dyfuzję, jak również penetrację jonów do wnętrza osadu cząstek. Z kolei zależność maksymalnej ilości jonów cynku usuniętych z roztworu od jego wyjściowego stężenia interpretowano stosując izotermę Langmuira i Freundlicha.

Topografię tworzonych kompleksów OWA z tlenkiem cynku i jonami cynku w postaci osadów analizowano przy pomocy metod SEM i TEM, wykazując że wielkość krystalitów ZnO wynosiła 41 nm . Przeprowadzono również modelowanie teoretyczne przy pomocy metody dynamiki molekularnej oraz metody DFT w celu obliczenia oddziaływań jonów cynku z różnymi aminokwasami cząsteczki OWA oraz mechanizmu

tworzenia kompleksów OWA/ZnO. Określono również działanie antybakteryjne syntezowanych preparatów wobec dwóch szczepów bakteryjnych oraz drożdży *C. albicans*.

Jako komentarz do analizy tych prac można przypuszczać, że wyniki uzyskane dla OWA byłyby łatwiejsze do interpretacji gdyby określono stabilność roztworów w funkcji pH i siły jonowej (metoda pomiaru wsp. dyfuzji, DLS), jak również ruchliwość elektroforetyczną cząsteczek białka (metoda elektroforetyczna LDV). Ponadto, znaczenie tych wyników byłoby szersze gdyby badania przeprowadzono dla wartości pH powyżej 4,5, gdy cząsteczki OWA uzyskują wypadkowy ładunek ujemny i tworzą znacznie bardziej stabilne roztwory, niż w punkcie izoelektrycznym.

Ze względu na inwazyjność metody SEM i TEM wobec warstewek organicznych, można oczekiwać, że pomiary te dobrze byłoby uzupełnić stosując dla porównania metodę analizy topologii kompozytów opartą na AFM, umożliwiającą pomiary w fazie ciekłej, a więc w kontrolowanych warunkach pH i siły jonowej.

Należałoby też bardziej precyzyjnie wyjaśnić w jaki sposób dyspergowano osady ZnO i kompleksy z OWA, aby uzyskać stabilne suspensje, co jest sporym wyzwaniem, zważywszy na duży rozmiar cząstek i ich znaczną gęstość, powodująca sedymentację.

Te uwagi nie wpływają na ogólną wysoką ocenę merytoryczną pracy, prosiłbym jednak doktorantkę o komentarz.

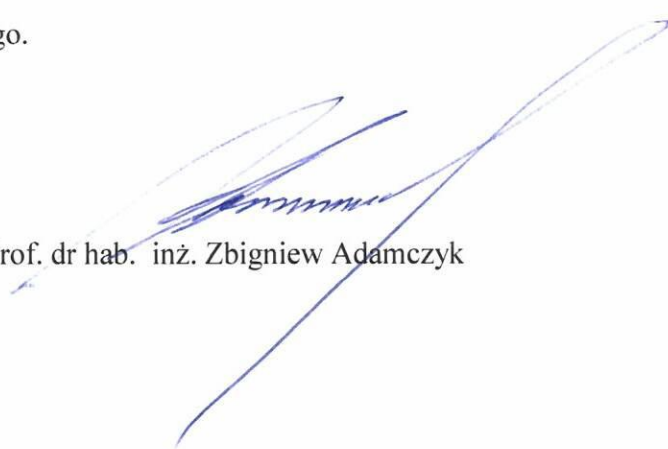
Podsumowując powyższą analizę można stwierdzić, że doktorantka zrealizowała obszerny zakres bardzo pracochłonnych badań doświadczalnych przy użyciu nowoczesnych technik badawczych. Uzyskała oryginalne wyniki o znaczeniu poznawczym, jak również określonym potencjale praktycznych zastosowań, co jest potwierdzone dwoma zgłoszeniami patentowymi.

Główne osiągnięcia naukowe, będące wynikiem tych badań to określenie mechanizmu tworzenia cząstek ZnO polegającego na redukcji uwodnionych kationów cynku przez grupy amidowe i karboksylowe pochodzące z cząsteczek białek bakteryjnych; opis zjawiska tworzenia się warstewek organicznych na powierzchni cząstek ZnO i wyznaczenie składu chemicznego tych warstewek; przeprowadzenie unikatowych badań wiązania kationów cynku przez cząsteczki owoalbuminy oraz

określenie mechanizmów i topologii tworzonych kompozytów; potwierdzenie znaczącego efektu bakteriostatycznego syntezowanych preparatów wobec szczepów Gram(+) oraz Gram(-) a także efektu przeciwwgrzybicznego.

3. Wniosek końcowy

Podsumowując analizę rozprawy doktorskiej mgr Anny Król-Górniak można stwierdzić, że uzyskane przez nią wyniki mają znaczenie poznawcze stanowią oryginalny wkład do dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie: nauki chemiczne. Z tego względu stwierdzam, że recenzowana praca doktorska spełnia wymogi ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. art. 187, oraz wnioskuję o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Zbigniew Adamczyk