



prof. dr hab. inż. Teofil Jesionowski
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3720, fax +48 61 665 3649
e-mail: teofil.jesionowski@put.poznan.pl

Poznań, 17.08.2017 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Doroty Anny Chełminiak-Dudkiewicz

z tytułu

„Struktura i właściwości nowych nanocząstek magnetycznych z powłokami polimerowymi jako potencjalnych nośników w katalizie”

opracowana na zlecenie Dziekana Wydziału Chemii

Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Rozprawa doktorska Pani mgr Doroty Anny Chełminiak-Dudkiewicz została zrealizowana w Katedrze Chemii i Fotochemii Polimerów Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę wykonano pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Haliny Kaczmarek, wysokiej klasy autorytetu i specjalistki w zakresie polimerów i obszarów pokrewnych. Promotorem pomocniczym dysertacji jest dr Marta Ziegler-Borowska.

Oceniając merytoryczną stronę pracy doktorskiej brano pod uwagę głównie oryginalność i nowatorski charakter badań, trafność wyboru problemu badawczego, jego realizację oraz znajomość wykorzystanych metod czy technik badawczych, jak również poprawność interpretacji wyników. Istotny, aczkolwiek dodatkowy, aspekt oceny stanowiły ponadto osiągnięcia naukowe Pani mgr Doroty Chełminiak-Dudkiewicz.

Należy podkreślić, że badania dotyczące dysertacji doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu SONATA 8, nr decyzji: 2014/15/D/NZ7/01805 oraz częściowo ze środków projektu „Krok w przyszłość – stypendia dla doktorantów V edycja”, co pośrednio dowodzi o istotności problematyki naukowej.

Przełom XX i XXI wieku to niewątpliwie rozwój wielu dziedzin czy dyscyplin naukowych. Najwyraźniejszy postęp obserwowany jest dla nanotechnologii. W ogromnej liczbie ośrodków naukowych, w tym uniwersyteckich, prowadzone są badania w zakresie wytwarzania, charakterystyki i zastosowań materiałów o rozdrobnieniu nanometrycznym. Należy pamiętać, że obok istotnych walorów, materiały te mogą implikować pewne skutki uboczne

(np. w zastosowaniach medycznych zwiększają alergię, wykazują działanie toksyczne, etc.). Stąd ciągły rozwój technologiczny czy materiałowy związany jest z opracowywaniem nowych, przyjaznych środowisku technologii bazujących na wykorzystaniu nanomateriałów o unikalnych, specyficznych właściwościach, bezpiecznych dla organizmów żywych i ekosystemu.

W ostatnich latach obserwuje się także liczne wykorzystanie procesów biokatalitycznych, jako alternatywy do powszechnie znanych reakcji realizowanych z wykorzystaniem katalizy konwencjonalnej (heterogenicznej czy homogenicznej). Biokataliza to kataliza reakcji chemicznych realizowana z użyciem biokatalizatorów, głównie enzymów, które znacząco obniżają ich barierę energetyczną; finalnie reakcje te osiągają stan równowagi z większą szybkością niż reakcje niekatalizowane. Ważnym zagadnieniem w tej dziedzinie jest dążenie do zmniejszenia kosztów pozyskiwania i stosowania preparatów enzymatycznych, np. w produkcji żywności, detergentów, kosmetyków, farmaceutyków oraz biopaliw. Sprzyja temu postęp w zakresie opracowywania nowych technik immobilizacji enzymów przyczyniających się do ich efektywnego unieruchomienia, optymalizacji aktywności czy wielokrotnego wykorzystania. Konsekwencją tych przedsięwzięć jest coraz powszechniej stosowana nanobiokataliza. O znaczeniu ww. kierunków badań świadczą dane statystyczne zaczerpnięte z bazy SCOPUS, z dn. 10.08.2017 r. I tak dla poszczególnych obszarów tematycznych wynoszą one odpowiednio: *nanotechnology* – 781962, *nanomaterials* – 237731, *biocatalysis* – 58323, *enzyme immobilization* – 119539, *lipase immobilization* – 17251, *magnetite* – 111919, *magnetite nanoparticles* – 36314, *chitosan* – 227745, *chitosan coatings* – 52512, *collagen* – 650085, *core-shell* – 326645.

Biorąc pod uwagę powyższe kwestie i dane uważam, że tematyka podjęta przez Doktorantkę jest aktualna, oryginalna, a co najważniejsze istotna z punktu widzenia rozwoju nauki.

Oceniana rozprawa doktorska została przedstawiona na 193 stronach maszynopisu. Pierwszy element pracy stanowią *Spis treści* oraz *Wykaz stosowanych skrótów*. Dalsze rozdziały to *Wstęp*, *Część teoretyczna* oraz *Cel i zakres pracy*. Następnie Doktorantka zawarła *Część eksperymentalną*, *Wyniki i dyskusję*, a także *Podsumowanie i wnioski*. Całość pracy wieńczą: *Streszczenie* (zredagowane w języku polskim i angielskim), *Spisy ilustracji i tabel oraz schematów*. Na końcu pracy zestawiono cytowane źródła literaturowe. Piśmiennictwo stanowi 145 aktualnych pozycji publikacyjnych i monograficznych. Struktura pracy jest klasyczna. Bogato zilustrowana rozprawa zawiera 77 rysunków i 20 tabel. Niestety jakość edytorska rysunków pozostawia wiele do życzenia. Większość z nich jest niskiej jakości,

a rezultaty badań to często „surowe” obrazy zaimportowane z urzędów badawczych (opisy zawierają anglojęzyczne frazy lub „mieszankę” języków polskiego i angielskiego).

W części literaturowej dysertacji Pani mgr Dorota Chełminiak-Dudkiewicz wprowadziła czytelnika do tematyki związanej z metodami syntezy nanocząstek magnetycznych, uwzględniając fizyczne, chemiczne i mikrobiologiczne metody ich otrzymania. Przedstawiając na rys. 2 dokładną i profesjonalną specyfikację procesów formownia tego rodzaju nanometrialów zawężono liczne osiągnięcia do roku 2012. Jak sama Autorka pracy wykazała, obserwuje się znaczny wzrost badań w tym obszarze, co potwierdzają przytoczone dane statystyczne. Spośród 33895 prac w zakresie *magnetic nanoparticles*, ponad 29300 artykułów naukowych zostało opublikowane w latach 2013-2017, a średnia z lat 2015-2016 wynosi aż 6613 publikacji rocznie.

W dalszej kolejności Doktoranta opisała zagadnienie stabilności nanocząstek magnetycznych – pojęcie to potraktowano jednak bardzo „powierzchniowo” (4 cytowania literaturowe, 4/3 stron maszynopisu). Również bardzo ważny aspekt dotyczący technik i metod charakterystyki nanocząstek potraktowano bardzo skrótowo (analogicznie 4/3 stron pracy) koncentrując się na najważniejszych aspektach, nie podając przykładowych rezultatów uprzednio opublikowanych przez innych naukowców. Chciałbym zwrócić także uwagę, że ładunek powierzchniowy może być wyznaczany poprzez zastosowanie miareczkowania potencjometrycznego czy adoptując inne techniki, a nie wyznaczając pośrednio potencjał dzeta. Wzajemną zależność ładunku powierzchniowego i potencjału elektrokinetycznego można uzyskać stosując przykładowo równanie Grahama (pochodna teorii Gouya-Chapmana). Potencjał elektrokinetyczny (dzeta) służy do opisu właściwości powierzchniowych ciał stałych ale zdyspergowanych w polarnych, bądź niepolarnych roztworach. Pozwala na obliczenie siły i energii oddziaływania między cząstkami koloidalnymi i na oszacowanie stabilności (odporności na koagulację) i lepkości dyspersji, jej właściwości flotacyjnych oraz na dobór właściwych odczynników do modyfikacji tych właściwości. Odpowiednie zdyspergowanie i stabilizacja związków nieorganicznych w układach dyspersyjnych stanowi istotny problem w różnych procesach technologicznych wpływając istotnie na właściwości produktu końcowego. Parametr ten ma także istotne znaczenie w procesach biotechnologicznych w tym w immobilizacji enzymów, ponadto w określaniu efektywności modyfikacji nanomateriałów (np. magnetytu).

Rozdział zatytułowany „Zastosowanie magnetycznych nanocząstek” przedstawiony na 41 stronach maszynopisu to bez wątpienia najwartościowsza część literaturowa ocenianej pracy. Wskazano w nim najistotniejsze kierunki użytkowe nanocząstek magnetycznych oraz

ich rolę w tych aplikacjach. Zgodnie z ideą rozprawy, zwrócono uwagę na wykorzystanie tego typu materiałów jako nośników biokatalizatorów. Wykazując cechy wyróżniające enzymy spośród innych substancji Pani mgr Dorota Chełminiak-Dudkiewicz podkreśla ich biodegradowalność. Nie jest to sformułowanie zbyt fortunne, gdyż zmniejszenie ryzyka wystąpienia reakcji ubocznych jest związane głównie z selektywnością i specyficnością enzymów. Biodegradowalność w przypadku enzymów ma bardzo negatywny wpływ na białko, bo obniża aktywność enzymu. Doktorantka wskazuje ponadto na duże znaczenie lipaz w procesach biokatalizacyjnych, nie podając w tym miejscu żadnych źródeł literaturowych, a są ich tysiące. Należy ponadto zaznaczyć, że lipazy w związku z powyższym są bardzo dokładnie opisane w literaturze przedmiotu. Niemniej jednak ich zastosowanie jako substancji/katalizatorów modelowych nie uważam za bezzasadne. Sam popełniłem kilka współautorskich prac z ich testowaniem.

W tej części pracy omówiono szczegółowo zagadnienie immobilizacji enzymów podając najistotniejsze informacje związane z efektywnością procesu, wydajnością czy możliwością ich wielokrotnego użycia. Scharakteryzowano także metody immobilizacji enzymów uwzględniając mechanizmy oddziaływań enzym – nośnik. Niestety Autorka pracy nie cytuje „najważniejszej” pracy przeglądowej wdanej w czasopiśmie *Adsorption* – 2014 rok (cytowana dotychczas 75 razy w uznanych czasopismach).

Trudno się zgodzić z tezą, że unieruchamianie enzymów wyklucza procesy wewnątrzcząsteczkowe, tj. agregację, gdyż metody sieciowania enzymów (CLEA: *Cross-linked enzyme aggregates*, CLEC: *Cross-linked enzyme crystals*) polegają właśnie na ich agregacji.

Na stronie 30 dysertacji wykazano czterdziestokrotny wzrost aktywności unieruchomionego enzymu w porównaniu do wolnej lipazy. Fakt ten wydaje się być sprzecznym w odniesieniu do stanu faktycznego, gdyż enzymy w stanie natywnym wykazują zazwyczaj dużo większą aktywność, a w przypadku odnotowania tak znaczącej poprawy właściwości katalizacyjnych białka związanego z nośnikiem, powinien on zostać wyjaśniony w pracy. Zupełnie inaczej wygląda fakt ich stabilności czy możliwości wydzielania z układu reakcyjnego. Chciałbym ponadto zaznaczyć, że reakcją modelową w testach enzymatycznych jest hydroliza palmitynianu *p*-nitrofenyłu (str. 33).

W dalszym opisie Doktorantka wykazała bardzo duże kompetencje w zakresie charakterystyki metody enkapsulacji enzymów poprzez modyfikacje nośników liczną grupą związków sprzęgających, wiążących czy/i sieciujących. Uważam że ten fragment pracy po odpowiednim

rozwinięciu mógłby stanowić podstawę do przygotowania krótkiego wartościowego artykułu przeglądowego (z ang. *mini review*).

Na stronie 40 niestety niepoprawnie naszkicowano strukturę 3-aminopropylotrietoksylanu, a schemat reakcji zamieszczono na rys. 17 a nie rys. 16 – jak zapisano w pracy. Przegląd literaturowy wieńczy tematyka związana z rozdzielaniem złożonych układów z wykorzystaniem nanocząstek magnetycznych. Doktorantka wskazała na liczne kierunki modyfikacji magnetytu związkami nieorganicznymi i głównie organicznymi związkami wielkocząsteczkowymi. Modyfikacje te nadają wytwarzanym układom hybrydowym liczne funkcje ułatwiające efektywność rozdziału czy zwiększające charakter oddziaływań związek magnetyczny – substancja „separowana”. Warty uznania jest fakt, że Pani mgr Dorota Chełminiak-Dudkiewicz niemal każdy z rozdziałów syntetycznie podsumowała, jednakowoż reasumując ostatni podrozdział nie wykazano jego znacznego związku z tematyką rozprawy.

Doktorantka, dokonując rzetelnej weryfikacji aktualnego stanu wiedzy, jak i nieporuszonych dotychczas kwestii, sformułowała złożony cel i zakres pracy, który obejmował syntezę nanocząstek magnetytu z modyfikowanymi powłokami polimerowymi, o potencjalnych zastosowaniach katalitycznych. Szczególny aspekt pracy związany był z oceną przydatności wytworzonych nośników w immobilizacji lipazy – jako modelowego biokatalizatora.

Do preparatyki nośników zaadaptowano nieskomplikowaną i niekosztowną metodę współwytrącania, w wyniku której otrzymano nanocząstki magnetytu, stabilizowane polimerami w formie wyjściowej oraz zmodyfikowane chemicznie, w celu zapewnienia efektywnej immobilizacji biokatalizatorów.

Na podstawie licznych i nowatorskich wariantów eksperymentalnych wytworzono nanocząstki magnetyczne pokryte chitozanem niemodyfikowanym; chitozanem z różną ilością pierwszorzędowych grup aminowych odsuniętych od łańcucha głównego polimeru; kolagenem; mieszaniną chitozanu oraz polimeru zawierającego ugrupowania amoniowych soli czwartorzędowych jako podstawniki boczne; a także mieszaniną chitozanu oraz kolagenu. Podczas syntez wykorzystano różne czynniki sieciujące, takie jak aldehyd glutarowy (można ten związek uznać jako modelowy), epichlorohydrynę oraz kwas kwadratowy, oceniając ich wpływ na skuteczność procesu immobilizacji. Tak zakrojone wieloaspektowe badania są godne podziwu i domniemam, że wynikają przynajmniej z dwóch aspektów: ponadprzeciętnych i niekwestionowanych kompetencji merytorycznych i technicznych Promotor pracy – Pani Profesor Haliny Kaczmarek – uznanego autorytetu na arenie międzynarodowej, jak i dużego zaangażowania i znaczącej wiedzy Doktorantki.

Dodatkowym celem było określenie wpływu warunków suszenia nośnika na aktywność unieruchomionego białka enzymatycznego. Autorka dysertacji zastosowała dwie metody, które rekomendowane są jako klasyczne techniki w procedurach otrzymywania biomateriałów: suszenie tradycyjne pod obniżonym ciśnieniem oraz suszenie liofilizacyjne.

Kluczowy zakres badań obejmował określenie efektywności immobilizacji. Ilość osadzonego na nanocząstkach biokatalizatora oznaczono mierząc początkowe i końcowe (tj. po immobilizacji) stężenie białka w supernatancie – metodą Bradforda, a aktywność katalityczną białka enzymatycznego wyznaczono przez miareczkowanie kwasu tłuszczowego, pochodzącego z hydrolizy oliwy z oliwek. Określono również możliwość wielokrotnego użycia biokatalizatorów w zaproponowanych procesach.

Wszechstronna charakterystyka wytwarzanych materiałów, jak i ewaluacja poszczególnych testów katalitycznych mogła być prowadzona dzięki zastosowaniu wielu metod i technik badawczych. Wymienić można spośród nich m.in. spektrofotometrię UV-Vis, spektroskopię ATR-FTIR, technikę DLS (*dynamic light scattering*), elektronową mikroskopię skaningową (SEM) i transmisyjną (TEM), niskotemperaturową sorpcję azotu, termogravimetrię (TG/DTA), spektrometrię ^1H i ^{13}C NMR, szerokokątową dyfrakcję promieniowania rentgenowskiego (XRD) oraz statyczny pomiar kąta zwilżania. Doktorantka zastosowała niezbędną aparaturę dzięki czemu ambitny cel pracy mógł być osiągnięty z sukcesem.

Pani mgr Dorota Anna Chełminiak-Dudkiewicz otrzymała układy nanocząstek $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ modyfikowanych chitozanem lub jego pochodnymi, chitozanem ze szczepionymi ugrupowaniami aminowymi z udziałem kolagenu, jak i dodatkowo wprowadzając jony poli[bromku N,N-dimetylo-N-benzylo-N-(etylo metakrylanu) amonu]. Modyfikacja chitozanu, dzięki selektywnym reakcjom podstawienia, pozwoliła na wprowadzenie do pierścieni glikozydowych 1-3 długich podstawników bocznych zakończonych grupami aminowymi, niezbędnymi do immobilizacji lipazy. Ten element pracy bez wątpienia można uznać za nowatorski, co ma wyraz w opublikowanych współautorskich pracach Autorki rozprawy – szczegóły tych osiągnięć przedstawię w dalszej części opinii.

Ponieważ raz stosowany był bufor fosforanowy o $\text{pH}=10$, potem bufor węglanowy o $\text{pH}=10$; proszę o wyjaśnienie czy zmiana rodzaju buforu miała wpływ na miejsce i ilość przyłączonych grup funkcyjnych? Niestety niektóre „powierzchowne” czy żargonowe stwierdzenia nie mogą także pozostać zignorowane przez recenzenta. Przykładowo Autorka napisała, że „Uzyskane modyfikowane polimery różnią się wizualnie od wyjściowego chitozanu jedynie barwą. Wszystkie pochodne $\text{CS-Et}(\text{NH}_2)$, $\text{CS-Et}(\text{NH}_2)_2$ i $\text{CS-Et}(\text{NH}_2)_3$ są koloru żółto-brązowego”. Uznaje ten komentarz jako mało profesjonalny, gdyż i właściwości chemiczne tego typu

materiałów, jaki i parametry kolorymetryczne są odmienne. Ponadto, powszechnie wiadomo, że „Panowie nie znają się na kolorach” to pozwalam sobie na stwierdzenie, że próbka wyjściowego chitozanu nie jest koloru żółto-brązowego (proszę uznać ten komentarz jako szowinistyczny). Aby precyzyjnie wyznaczyć kolory trzeba np. zaimplementować system barw CIE $L^*a^*b^*$.

Doktorantka do syntezy nanomateriałów wybrała ekonomiczną metodę współwytrącania *in situ* (w temperaturze pokojowej) oraz zastosowała różne czynniki sieciujące, takie jak: aldehyd glutarowy, epichlorohydrynę oraz kwas kwadratowy, dzięki czemu uzyskano trwałe powłoki ochronne. Tu można by się pokusić o inne kierunki generowania nanostruktur magnetytu, np. w syntezie solwo- czy hydrotermalnej lub stosując technikę mikrofalową. Zważywszy jednak na późniejsze problemy ze zwiększaniem skali metody strąceniowe wydają się być najbardziej optymalnymi. Problem stanowi natomiast agregacja cząstek czy jednorodność generowanych form nanometrycznych lub mikroskopowych. Budowę chemiczną czy strukturalną wytworzonych powłok polimerowych oraz nanomateriałów magnetycznych scharakteryzowano wykorzystując analizy spektroskopowe ATR-FTIR oraz ^{13}C NMR. Szkoda, że na widmach NMR nie przedstawiono referencyjnej próbki chitozanu. Z kolei właściwości dyspersyjne, morfologiczne i strukturalne nanocząstek magnetytu oszacowano bazując na pomiarach promienia hydrodynamicznego (technika DLS), obserwacjach mikroskopowych (głównie TEM), jak i pomiarach dyfraktometrycznych (XRD). Autorka pracy stwierdziła, że wielkość cząstek nie przekracza kilkudziesięciu nanometrów. Przeprowadzona analiza XRD pozwoliła na potwierdzenie, że rdzeń nanocząstek magnetycznych stanowi czysty magnetyt. Nie jestem natomiast pewien czy przedstawiony rentgenogram dla magnetytu – rys. 58a to odpowiednik próbki zsyntezowanej przez Doktorantkę czy jest on tylko zaczerpnięty z bazy X'Pert High Score celem dokonania opisu otrzymanych rezultatów?

Zdjęcia TEM i pomiary DLS posłużyły Pani mgr Dorocie Chełminiak-Dudkiewicz do scharakteryzowania różnic w rozmiarach i morfologii powierzchni otrzymanego materiału magnetycznego. W większości przypadków średnie rozmiary, na ogół sferycznych nanocząstek, nie przekraczały 25 nm. Jednocześnie nanocząstki charakteryzowały się małym rozrzutem wielkości, co ma istotne znaczenie w przypadku zastosowań biologicznych. Doktorantka stwierdziła, że rodzaj powłoki wpływa na średnią wielkość nanocząstek magnetycznych. Spośród wszystkich badanych nanomateriałów nanocząstki pokryte mieszaniną chitozanu i kolagenu usieciowane kwasem kwadratowym ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Coll-SqA}$) charakteryzują się największym rozmiarem (32 nm), natomiast nanocząstki pokryte chitozanem usieciowanym aldehydem glutarowym mają najmniejszy średni rozmiar (16 nm) wśród

badanych układów. Niestety zamieszczone obrazy mikroskopowe SEM czy TEM nie zawsze korelują z pomiarami DLS. Doktorantka podała także wartości współczynnika polidispersyjności (PdI), który niepoprawnie nazywa w pracy.

W celu potencjalnego zastosowania otrzymanych nanocząstek jako katalizatorów chemicznych, Autorka pracy określiła zakres ich stosowania w podwyższonych temperaturach, wykorzystując analizę termogravimetryczną. Najstabilniejszym układem okazał się magnetyt pokryty mieszaniną chitozanu i poli[bromkiem N,N-dimetylo-N-benzylo-N-(etylo metakrylanu) amonu] sieciowany aldehydem glutarowym. Tu pozwolę sobie na komentarz, że reakcje biokatalityczne realizuje się w relatywnie niskich zakresach temperaturowych, co czyni je konkurencyjnymi z katalizą konwencjonalną (z reguły wysokotemperaturową). Ale nie chcę deprecjonować testów stabilności termicznych, gdyż są one istotne w ocenie trwałości oddziaływań czy niezmiernie ważne w przypadku innych zastosowań wytworzonych układów hybrydowych. Analogicznie jak w przypadku innych analiz, w testach termicznych nie pokazano próbki referencyjnej (Fe_3O_4).

Innym ważnym aspektem badań była ocena charakteru hydrofilowo-hydrofobowego badanych układów. Doktorantka wykazała, że wprowadzenie dwóch łańcuchów aminowych do powłoki chitozanowej prowadzi do zwiększenia hydrofilowości, lecz ilość grup aminowych nie jest jedynym czynnikiem decydującym o właściwościach powierzchniowych i biologicznych. Stosując metodę ninhydrynową wykazano, że najmniej grup aminowych występuje w nanocząstkach $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Coll-SqA}$ (2,05 mM/g), natomiast najwięcej w $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)_3$ (8,34 mM/g). Chitozan $\text{CS-Et}(\text{NH}_2)_2$ charakteryzuje się większą hydrofilowością w porównaniu do czystego chitozanu oraz pozostałych dwóch pochodnych $\text{CS-Et}(\text{NH}_2)$ i $\text{CS-Et}(\text{NH}_2)_3$, co może być efektem odmiennej konformacji dwóch odsuniętych od łańcucha grup aminowych obecnych na powierzchni tej pochodnej. Dostępność tych grup sprzyja możliwości tworzenia wiązań wodorowych ze związkami polarnymi oraz zwiększa powinowactwo osadzonych substancji katalitycznych. Zarówno poli[bromek N,N-dimetylo-N-benzylo-N-(etylo metakrylanu) amonu], jak i kolagen wykazują stosunkowo dużą hydrofilowość. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że immobilizacja enzymów łatwiej „zachodzi” w środowiskach niepolarnych.

Pani mgr Dorota Chełminiak-Dudkiewicz na podstawie testów biokatalitycznych wykazała, że wszystkie otrzymane nanomateriały są dobrymi nośnikami enzymu – lipazy z *Candida rugosa*. Największą zdolność do immobilizacji tego enzymu wykazuje nanomateriał $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)_3$. Na nanomateriale $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)_3$ unieruchomiono najwięcej białka enzymatycznego (233 mg/g). Ciekawe wyniki uzyskano dla nanocząstek pokrytych polimerami

usieciowanymi kwasem kwadratowym. Należy także dodać, że wytworzone układy biokatalityczne charakteryzują się wysoką aktywnością przy stosunkowo małej ilości unieruchomionego enzymu, co niewątpliwie jest zaletą odpowiedniego przygotowania nośnika, jak i właściwego przeprowadzenia procesu immobilizacji przez Doktorantkę.

Doktorantka jednoznacznie wykazała, że ilość grup aminowych obecnych na powierzchni nanocząstek również wpływa na proces immobilizacji. Najwyższą aktywność uzyskano dla nanocząstek magnetycznych pokrytych chitozanem z jedną grupą aminową w jednostkach glukozydowych, odsuniętą od łańcucha głównego chitozanu ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)$ – 89%). Wyniki otrzymane dla pozostałych dwóch rodzajów nanonośników z tej serii ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)$ i $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-Et}(\text{NH}_2)_3$) potwierdzają, że zawady przestrzenne oraz różnice w hydrofilowości negatywnie wpływają na aktywność lipazy. Należy podkreślić, że poza nowatorskim i użytkowym aspektem, zaprezentowane wyniki badań mogą stanowić podstawę do opracowania i rozwoju teorii na temat wpływu ilości, rodzaju oraz położenia grup funkcyjnych w strukturze nośnika na wydajność procesu immobilizacji nie tylko lipaz, lecz również enzymów z innych grup katalitycznych. Fakt ten niewątpliwie może mieć istotny wpływ na rozwój właściwych temu dziedziny nauki oraz pozwolić na praktyczne wykorzystanie wytworzonych systemów w reakcjach prowadzonych w skali przemysłowej.

Autorka pracy doktorskiej udowodniła, że zmiana warunków obróbki termicznej nośników (dóbr techniki suszenia), ma istotny wpływ na immobilizację enzymu na powierzchni nanocząstek magnetycznych (więcej enzymu unieruchomiono na materiale suszonym metoda liofilizacyjną). Uważam, że ciekawe byłoby zastosowanie suszenia rozpyłowego, które mogłoby stanowić alternatywę zarówno w odniesieniu do generowania nośników o zdefiniowanej strukturze porowatej, jak i umożliwić bezpośrednie prowadzenie modyfikacji i immobilizacji (metodą enkapsulacji). Oczywiście jestem świadomy, że implementacja tej techniki wymagałaby przeprowadzenia licznych optymalizacji procesowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, że lipaza immobilizowana na otrzymanych nanomateriałach charakteryzuje się dobrą stabilnością i możliwością wielokrotnego użycia (po 10-tym testowanym cyklu aktywność wynosiła powyżej 60%).

Dokonując oceny materiału doświadczalnego w zakresie enzymów nasuwa się kilka pytań czy komentarzy. Warto pamiętać, że lipazy katalizują nie tylko hydrolizę ale również transestryfikację, a mogą i estryfikację i syntezę, w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika oraz warunków procesowych. Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób wydzielono układy po immobilizacji z mieszaniny? Nie doszukałem się w pracy informacji na ten temat. Autorka stwierdza, że wzrost ilości enzymu po immobilizacji wiąże się ze wzrostem jego

aktywności – niestety nie jest to prawidłowość, gdyż przy pewnym stężeniu osiąga się maksymalną aktywność. Proszę także o wyjaśnienie dlaczego, i w jaki sposób oddziaływanie aldehydu glutarowego z enzymem zmniejsza jego aktywność?

Chciałbym wyraźnie podkreślić, że otwarta i zamknięta forma lipazy są związane głównie z hydrofobowością środowiska, a nie zawadami przestrzennymi. Co więcej, konformacja lipazy nie ma bezpośredniego wpływu na to jak enzym reaguje z nośnikiem. Ma jednak wpływ na to jak enzym katalizuje dane reakcje.

Proszę także o dokładne wyjaśnienie z czym wiąże się obniżenie aktywności biokatalizatora po immobilizacji, a z czym wiąże się jego wysoka stabilność?

Po analizie rezultatów nasuwa się jeszcze jedno pytanie: z czym związane jest zachowanie wysokiej aktywności katalitycznej enzymu nawet po 10 cyklach i dodatkowo z czym związane jest to, że zastosowanie kolagenu i kwasu kwadratowego powoduje, że lipaza zachowuje najwyższą aktywność?

Podsumowując bardzo bogaty materiał doświadczalny, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Pani mgr Dorota Anna Chełminiak-Dudkiewicz otrzymała nową grupę modyfikowanych nanoosników magnetycznych mogących znaleźć zastosowanie w procesach biokatalitycznych, jak i stanowić interesującą grupę materiałów do innych aplikacji (zastosowania medyczne i farmaceutyczne, ochrona środowiska).

Wartym podkreślenia jest fakt, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania mają charakter poznawczy oraz użyteczny.

Oceniając pracę w ujęciu edytorskim stwierdzam, że ogólnie jest ona zredagowana poprawnie językowo i stylistycznie. Niemniej jednak, Doktorantka nie ustrzegła się licznych błędów czy nieprawidłowości. Ze względu na fakt, że ich ranga jest dość mała, nie artykułuję ich szczegółowo w przygotowanej opinii. Niektóre z nich to: pomyłki w numeracji rysunków czy „nieświadomie skrócony” ich podpis; niewłaściwie wkomponowana str. 80 w pracy; pojawiający się slang (np. „ziarna pyłku”, „(rozkład nie jest ani bardzo polidispersyjny, ani szeroki, ani wąski)"); zróżnicowany zapis jednostek (mL oraz ml); brak jonu Br⁻ w strukturze bromku N,N-dimetylo-N-benzylo-N-(etylo metakrylanu) amonu, etc.

Warto także pamiętać, że parametrów struktury porowatej (powierzchnia właściwa, rozmiar oraz objętość porów) nie można traktować jako właściwości powierzchniowych nanomateriałów – to bardzo duże uproszczenie, ponadto nieprawidłowe.

Proszę aby Doktorantka, podczas publicznej obrony pracy odniosła się tylko do najważniejszych kwestii, gdyż większość uwag, pytań czy komentarzy wynika z obowiązku recenzenta, jakim jest ich wskazanie czy zaznaczenie, a z pewnością nie pomniejszają one

wysokiej wartości merytorycznej ocenianej rozprawy. Komentarze wynikają ponadto z dużego zainteresowania opisanymi w pracy zagadnieniami i rezultatami.

Chciałbym wyraźnie podkreślić bardzo wysoką wartość naukową i utylitarną zrealizowanej pracy, co jednoznacznie potwierdzają osiągnięcia publikacyjne Doktorantki. Pani mgr Dorota Anna Chełminiak-Dudkiewicz jest współautorką 12 oryginalnych prac naukowych o wysokim oddziaływaniu: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (2 prace), *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, Materials Letters* (2 artykuły), *Polimery* (2 publikacje), *Applied Surface Science*, *Catalysts*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Tetrahedron Asymmetry*. Prace doktorantki są cytowane ponad 55 razy, mimo bardzo krótkiego okresu od ich ukazania się. Efektywność naukowa Autorki pracy zasługuje na najwyższe uznanie i wyróżnienie. Mimo, że w obecnym czasie Doktoranci wykazują istotny postęp w tym zakresie to nie jest to niestety reguła. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o zgłoszenie wynalazku czy wynalazków, co w świetle znaczenia nowatorskiego czy praktycznego uzyskanych rezultatów jest niezmiernie ważne czy nawet kluczowe. Być może fakt ten ma miejsce, jednakże mi o tym nie wiadomo, mimo prób analizy tych osiągnięć na stronach UP RP.

Przyjętym zwyczajem jest zamieszczanie dorobku naukowego Autora/Autorki pracy, co bezpośrednio informuje o jego potencjale naukowym. Prawdopodobnie Doktorantka rezultaty swoich badań przedstawiała w formie licznych komunikatów czy plakatów, na konferencjach o zasięgu krajowym, jak i międzynarodowym. Tej informacji także nie ma, choć pamiętam osobisty udział Pani mgr Doroty Chełminiak-Dudkiewicz na konferencji BioOrg 2015 organizowanej w mojej macierzystej Uczelni i bardzo owocną, merytoryczną dyskusję z Doktorantką podczas sesji posterowej.

W tym miejscu chciałbym zaznaczyć istotny wkład Pani Doroty Anny Chełminiak-Dudkiewicz w rozwój chemii i dziedzin pokrewnych. Sposób zaplanowania eksperymentów, zrealizowania badań, jak i forma przedstawienia wyników oraz ich wnikliwa i rzeczowa analiza, świadczą o niekwestionowanych wysokich kompetencjach naukowo-badawczych Autorki rozprawy i są dowodem Jej wysokiego poziomu przygotowania do prowadzenia badań naukowych.

Na podstawie oceny pracy doktorskiej Pani mgr Doroty Anna Chełminiak-Dudkiewicz zatytułowanej „Struktura i właściwości nowych nanocząstek magnetycznych z powłokami polimerowymi jako potencjalnych nośników w katalizie” jednoznacznie stwierdzam, że

recenzowana rozprawa spełnia wszystkie wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65, poz. 595 z 16.04.2003 r., wraz z późniejszymi zmianami), wnioskuję ponadto do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie pracy i przeprowadzenie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę zakres oraz poziom (znacznie przekraczający standardy) oraz niepodważalne znaczenie wykonanych badań (mimo moich licznych uwag czy komentarzy, które wynikają z wartościowego i cennego materiału badawczego zawartego w ocenianej pracy) dla rozwoju dyscypliny naukowej, jaką reprezentuje Pani mgr Dorota Anna Chelminiak-Dudkiewicz oraz znaczącą aktywność naukową Doktorantki, wnoszę o wyróżnienie pracy, z zastrzeżeniem spełnienia warunków dodatkowych Wydziału, o ile takowe istnieją.

