

Dr hab. Tadeusz Paszko, prof. UP
Katedra Chemii
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy Lublinie

Lublin, dn. 28.07.2021 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Katarzyny Złotko

pt. „Sorpcja metali ciężkich na alfa-glukanach i chitynie”

wykonanej w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego

Polskiej Akademii Nauk

pod kierunkiem Promotora

prof. dr hab. Andrzeja Bieganowskiego

oraz

dr hab. Adama Waśko, prof. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Opracowanie niniejszej recenzji jest uzasadnione uchwałą Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN z dnia 09.07.2021 o powołaniu mnie na Recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Złotko pt. „Sorpcja metali ciężkich na alfa-glukanach i chitynie”.

Dobór i znaczenie tematu

W XXI wieku coraz większy nacisk i środki przeznaczają się na zwiększenie czystości powietrza, wód, gleb, a także podniesienie jakości żywności. Zanieczyszczenie wód i gleb kationami metali ciężkich, które jest spowodowane przede wszystkim rozwojem przemysłu jest ciągle dużym problemem. Problemem jest również utylizacja odpadów po produkcji przemysłowej i produkcji żywności. Dąży się do oczyszczania wód i zagospodarowania odpadów metodami najwydajniejszymi, w jak największym stopniu opartymi o naturalne

procesy zachodzące w przyrodzie i emitującymi jak najmniej CO₂. Jednak wdrożenie nowych bardziej przyjaznych dla środowiska technologii wymaga przeprowadzenia wielokierunkowych badań. Jednym z takich odpadów jest podłoże wraz z grzybnią po produkcji grzybów do celów spożywczych. Obecnie wykorzystuje się je głównie poprzez kompostowanie i produkcję biogazu. Jednak badania, dotyczące sorpcji kationów metali ciężkich przez polisacharydy, wchodzące w skład grzybni i owocników grzybów, które są znane z dużej akumulacji metali ciężkich; mogą doprowadzić do powstania nowych sorbentów, tak samo wydajnych jak te produkowane obecnie na bazie polimerów przez przemysł chemiczny, lecz ulegających łatwo biodegradacji.

Spożycie owadów nie jest popularne w Europie, lecz dla około 2 miliardów ludzi na świecie jest to jedno ze źródeł białka, witamin, błonnika i minerałów. Hodowla owadów, do której można wykorzystać wiele odpadów organicznych, może być też prowadzona w kierunku otrzymania biopaliwa oraz chityny i chitosanu. Chityna, która jest polisacharydem wchodzącym w skład ciała owada, może być potencjalnie tak samo wydajnym biosorbentem jak polisacharydy wyizolowane z grzybów.

Z powyższych powodów uważam, że wybrany przez mgr Katarzynę Złotko temat badań jest jak najbardziej zasadny, wpisujący się w obecne trendy w nauce.

Ocena formalnej strony pracy

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Złotko składa się z publikacji przeglądowej i dwóch oryginalnych prac twórczych, spójnych pod względem tematycznym i poświęconych dwóm biosorbentom: opracowaniu optymalnej metodyki ich otrzymywania, badaniom ich właściwości fizyko-chemicznych oraz zdolności do sorpcji metali ciężkich. Jednym z nich były pozyskane z grzybów (1→3)- α -D-glukany. Drugim biosorbentem była wyizolowana z wylinek poczwarek owada *Hermetia illucens* chityna. W przypadku (1→3)- α -D-glukanów badano sorpcję kationów Ni⁺², Cd²⁺, Zn²⁺ i Pb²⁺, natomiast w przypadku chityny za reprezentacyjne uznano kationy Ni²⁺. Do publikacji zostało dołączone 47-stronicowe omówienie osiągnięć badawczych, uzyskanych w ramach realizacji dysertacji, w którym przedstawiono zasadniczy i szczegółowe cele pracy oraz hipotezę badawczą. Zawiera ono cztery rozdziały oraz wnioski i bibliografię składającą się z aż 198 pozycji literatury, przede wszystkim anglojęzycznej. Przedstawiony układ opracowania jest logiczny i przejrzysty.

Tytuł dobrze odzwierciedla zasadniczy cel przeprowadzonych badań, jakim było określenie zdolności (1→3)- α -D-glukanów i chityny do sorpcji wybranych metali ciężkich.

Przedstawiony do oceny zbiór trzech publikacji, stanowiący podstawę do ubiegania się o tytuł doktora w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, posiada łączny współczynnik IF = 12.758 (zgodnie z rokiem opublikowania, w przypadku pracy z 2021 roku IF za rok 2020) i łączną punktację MEiN 300 pkt. Prace zostały opublikowane w czasopismach takich jak: *Molecules*, *International Journal of Biological Macromolecules* i *Polymers*. Skład autorski tych publikacji obejmuje od 6 do 7 autorów. We wszystkich pracach mgr Katarzyna Złotko była pierwszym autorem, a w dwóch pracach była również autorem korespondencyjnym. Z analizy oświadczeń wynika duży udział Doktorantki w tworzeniu publikacji. W znaczącym stopniu (przy udziale Promotorów) była pomysłodawczynią prac, opracowała ich koncepcję, samodzielnie wykonywała część pomiarów, opracowała uzyskane wyniki, przygotowała pierwszą wersję manuskryptów, merytorycznie i technicznie opracowywała sugestie i poprawki sugerowane przez współautorów publikacji. Współautorzy określili w oświadczeniach swój wkład do poszczególnych publikacji oraz wyrazili zgodę, żeby publikacje zostały wykorzystane w przewodzie doktorskim mgr Katarzyny Złotko. O dużym udziale Doktorantki świadczy również fakt, że w dwóch pracach była autorem korespondencyjnym. Autor korespondencyjny przygotowuje pod względem merytorycznym i technicznym wersję pracy, wysyłaną do redakcji czasopisma, ustosunkowuje się do uwag Recenzentów i na nim spoczywa obowiązek wykonania odpowiednich korekt, zgodnych z uwagami Recenzentów, do finalnej wersji publikacji.

Ocena merytorycznej strony pracy

Pierwsza praca z cyklu przedstawionego do oceny, czyli publikacja przeglądowa pt. „Report on Fungal (1→3)- α -D-Glucans: Properties, Functions and Application” została opublikowana w *Molecules* (2019, 24, 3972). We wstępie pracy dokonano podziału glukanów, omówiono ich budowę strukturalną oraz występowanie w przyrodzie. Następnie skoncentrowano się na najmniej zbadanych (1→3)- α -D-glukanach, omówiono ich umiejscowienie w ścianie komórkowej grzyba oraz zakresy ich zawartości w owocnikach i grzybni różnych gatunków grzybów. Następnym zagadnieniem omówionym w publikacji była aktywność biologiczna glukanów. Omówiono aktywność immunomodulacyjną i przeciwnowotworową glukanów. Kolejnym poruszonym zagadnieniem było pełnienie przez glukany roli induktora syntezy enzymów, czyli (1→3)- α -D-glukanaz, katalizujących

hydrolizę wiązań glikozydowych. Omówiono też zdolności glukanów do immobilizacji enzymów oraz ich właściwości prebiotyczne, bowiem ekstrakty z grzybów stymulują wzrost bakterii probiotycznych. Omówiono też rolę (1→3)- α -D-glukanów występujących w ścianach komórkowych patogenów grzybowych, tj. blokowanie enzymów roślinnych powodujących degradację grzyba, oraz blokowanie zdolności rośliny do rozpoznawania składników chemicznych grzyba. Podobną funkcję chroniącą organizm grzyba pełnią (1→3)- α -D-glukany, występujące w ścianie komórkowej grzyba *Aspergillus fumigatus*, powodującego aspergilozę płuc.

Następnie opisano metodykę izolacji grzybowych (1→3)- α -D-glukanów składającą się z etapu usuwania frakcji rozpuszczalnej w wodzie, etapu otrzymania frakcji rozpuszczalnej w alkaliach, następnie etapu jej neutralizacji i płukania. Omówiono też odmiany polimorficzne glukanów, w tym natywną postać I. Dalsza część pracy była poświęcona aktualnemu stanowi wiedzy, dotyczącemu budowy strukturalnej (1→3)- α -D-glukanów. Z części tej wynika, że mogą one występować w postaci pojedynczej i podwójnej helisy, a poza wiązaniami glikozydowymi (1→3) występują w nich też wiązania (1→4) oraz (1→6).

Kolejnym zagadnieniem poruszonym w pracy była akumulacja metali ciężkich w grzybach. Omówiono pobieranie bierne, czyli biosorpcję kationów metali na powierzchni ścian komórkowych żywej lub martwej masy grzybowej. Określono najważniejsze mechanizmy biorące udział w wiązaniu kationów metali na powierzchni ściany komórkowej. Omówiono też pobieranie aktywne, które zachodzi wolniej, lecz badania wskazują, że akumulacja metali przez pobieranie aktywne jest większa niż poprzez biosorpcję.

W drugiej publikacji przedstawionej do oceny (Nowak K., Wiater A., Choma A., Wiącek D., Bieganowski A., Siwulski M., Waśko A.: Fungal (1→3)- α -D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals. *International Journal of Biological Macromolecules* 2019, 137, 960–965.) przedstawiono badania skринingowe sorpcji kationów metali ciężkich (Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} i Pb^{2+}) na (1→3)- α -D-glukanach wyizolowanych z owocników lub grzybni 16 gatunków grzybów, w tym trzech odmian grzyba *Lentinus edodes*. Sorpcję przeprowadzano przez 24 godziny przy stosunku adsorbent: roztwór 1:100 stosując zliofilizowane (1→3)- α -D-glukany w postaci proszku i roztwory azotanów(V) badanych metali o stężeniu 100 mg dm^{-3} . Badania wykazały, że (1→3)- α -D-glukany wyizolowane z trzech gatunków grzybów wykazywały dużą pojemność sorpcyjną do badanych kationów metali ciężkich. (1→3)- α -D-glukany wyizolowane z gatunku *Lentinus edodes*, odmiany SH

37, wytypowano do dalszych badań, które miały na celu poznanie struktury biosorbenta. Badania wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowo-jonowego (SEM) i mikroskopu optycznego wykazały istnienie rozwiniętej struktury powierzchni glukanu z widocznymi włóknami i płatkami. Następnie przy pomocy proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej wykazano niewielki indeks krystaliczności badanego polisacharydu (8.5%). Przegląd literatury sugerował, że może to być wskaźnik dużej zdolności biopolimeru do sorpcji kationów metali ciężkich. Przy pomocy spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera i spektroskopii Ramana określono charakterystyczne grupy funkcyjne i wiązania badanego polisacharydu. Miedzy innymi zidentyfikowano pasma odpowiadające wiązaniom α -(1 \rightarrow 3)-glikozydowym oraz α -(1 \rightarrow 4)-glikozydowym, oraz pasma rozciągające grup hydroksylowych (3282 cm^{-1} i 2914 cm^{-1}). Analiza próbek z zasorbowanymi kationami Pb^{2+} wykazała występowanie przesunięcia powyższych pasm, wskazujące na udział grup hydroksylowych w sorpcji kationów. Ponadto zaobserwowano przesunięcie pasm z pikiem przy 1635 cm^{-1} oraz przy 1015 cm^{-1} . Podobne wyniki otrzymano również w przypadku pozostałych kationów metali. Zaobserwowane przesunięcia świadczą o udziale grup hydroksylowych w sorpcji badanych metali ciężkich.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę metylacyjną. Badanie to wykazało, że polisacharyd był zbudowany głównie z glukozy (75.9%) i mannozy (19.5%) oraz niewielkich ilości ksylozy. Ponadto wyniki wskazywały, że główny łańcuch składał się z glukozy połączonej wiązaniami (1 \rightarrow 3) (86.5%). Glukoza była też terminalnym monosacharydem. Ponadto, fragmenty polisacharydu posiadały połączenie (1 \rightarrow 4) (5.3%).

Do badania struktury wykorzystano również technikę jedno- (1D) i dwuwymiarowego (2D) homojądrowego ^1H NMR oraz dwuwymiarowego (2D) heterojądrowego ^1H - ^{13}C NMR. Przy pomocy powyższych technik wykryto, że analizowany biosorbent składa się z dwóch rodzajów polimerów. Głównym polimerem był (1 \rightarrow 3)- α -D-glukan (86%) lecz w niewielkiej ilości (14%) występował również polisacharyd zbudowany z cząsteczek α -D-glukozy połączonej wiązaniem (1 \rightarrow 4).

We wnioskach stwierdzono, że dominującym mechanizmem akumulacji metali ciężkich przez *Lentinus edodes* jest ich sorpcja na ścianach komórkowych zbudowanych z polisacharydów. Podsumowując, z pracy wynika, że biorąc pod uwagę niski koszt otrzymania (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanów z odpadów po produkcji *Lentinus edodes* i efektywność sorpcji kationów metali ciężkich, glukany te są obiecującymi biosorbentami metali ciężkich.

Powyższą pracę oceniam bardzo wysoko, w szczególności badania dotyczące składu chemicznego i struktury biosorbenta.

W ostatniej publikacji cyklu (Złotko K., Waśko A., Kamiński D.M., Budziak-Wieczorek I., Bulak P., Bieganowski A.: Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and its usage to metal sorption. *Polymers* 2021, 13, 818.) przedstawiono zmodyfikowaną przez autorów metodykę izolacji chityny z wylinek pozyskanych z poczwerek owada *Hermetia illucens*, wyhodowanych w skali laboratoryjnej w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie. Po oczyszczeniu i zmieleniu wylinek chityna była izolowana z użyciem trójetapowej metody izolacji, składającej się z demineralizacji z użyciem 1 M HCl, następnie deprotonizacji w podwyższonej temperaturze w obecności 1M NaOH. Trzeci etap, którym była depigmentacja chityny, przeprowadzono w czterech wariantach z użyciem wody, 9% H₂O₂, oraz 1% KMnO₄. Ponadto badano chitynę bez etapu depigmentacji. Wydajność pozyskiwania chityny dla pięciu wariantów procedury jej depigmentacji mieściła się w przedziale 5.6-7.97%. Pozyskane próbki chityny badano przy użyciu mikroskopii optycznej i konfokalnej. Okazało się, że chityna miała powierzchnię o strukturze składającej się z sześciokątnych jednostek przypominających plaster miodu, w szczególności w wariacie depigmentacji z użyciem 9% H₂O₂ przez 2.5 godziny. Chityna uzyskana z użyciem tego wariantu, mająca najbardziej rozbudowaną powierzchnię, została użyta do doświadczeń mających na celu określenie jej zdolności do sorpcji kationów Ni²⁺. Próbki chityny pozyskane z użyciem pięciu sposobów depigmentacji oraz próbki poddane sorpcji zostały zliofilizowane, a następnie poddane badaniom instrumentalnym.

Poza wspomnianymi badaniami z użyciem mikroskopu optycznego, próbki były badane przy pomocy proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej. Stwierdzono, że: chityna występowała w postaci α , jej poziom krystaliczności wynosił 60%, wielkość kryształów chityny wynosiła ~80 nm, w dwóch wariantach pozyskiwania występowały śladowe ilości krzemionki. Ponadto w zliofilizowanej próbce po sorpcji Ni²⁺ stwierdzono występowanie wyraźnego i ostrego odbicia świadczącego o sorpcji kationów Ni²⁺. Głównym wynikiem analizy termogravimetrycznej było stwierdzenie, że rozkład chityny następował w temperaturze 356-392°C, czyli w typowym zakresie dla chityny. Wykorzystanie techniki FTIR pozwoliło na określenie najważniejszych grup funkcyjnych występujących w chitynie. Ponadto w próbce z zasorbowanymi kationami Ni²⁺ stwierdzono niewielkie przesunięcie pasm o wierzchołkach przy 3380 i 2920 cm⁻¹ świadczące o możliwości kompleksowania kationów Ni²⁺ przez grupy hydroksylowe występujące w chitynie. Bardzo wysoko oceniam

wykonane analizy instrumentalne, między innymi pomysł zastosowania mikroskopu skaningowego do wykonania analiz techniką spektroskopii EDX (spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii). Metoda potwierdziła występowanie sorpcji kationów Ni^{2+} na powierzchni chityny i umożliwiła określenie zakresu sorpcji. Ponadto analiza pierwiastkowa sugerowała wymianę jonową jako jeden z występujących mechanizmów sorpcji.

Doświadczenia dotyczące sorpcji kationów Ni^{2+} na chitynie wykazały, że pojemność sorpcyjna tego biosorbenta w stosunku do badanego metalu jest dosyć niska. Jednak właściwości tego pierwiastka powodują, że jego kationy wykazują małe powinowactwo do wielu sorbentów. Brakuje mi w tej pracy pewnych szczegółów dotyczących sposobu przeprowadzania doświadczeń sorpcyjnych, np. czasu przeprowadzania procesu adsorpcji. Czas ten (24 h) znalazłem dopiero w omówieniu osiągnięć Doktorantki. Ponadto wydaje mi się, że dla kształtu izotermy przedstawionego na Rys. 6 publikacji lepsze wyniki powinien dawać model Langmuira niż Freundlicha, a w modelu Freundlicha wartość parametru $1/n$ powinna być, biorąc pod uwagę kształt izotermy, < 1 . Z powyższych względów proszę o sprawdzenie, czy do Tabeli 3 nie wkradły się jakieś błędy edycyjne. Jednak powyższe domniemane uchybienia mają według mnie charakter techniczny/edycyjny i nie obniżają wysokiej wartości pracy, opublikowanej w czasopiśmie o wysokim IF, w której poza zakresem sorpcji Ni^{2+} określono również bardzo trudne do zbadania metodami instrumentalnymi mechanizmy sorpcji.

Cykl publikacji został podsumowany dziewięcioma wnioskami końcowymi znajdującymi się w streszczeniu. Są one w mojej ocenie poprawnie sformułowane i mają potwierdzenie w przedstawionych wynikach badań. Podsumowując, w swojej rozprawie mgr Katarzyna Złotko podjęła bardzo interesującą, w niektórych aspektach pionierską tematykę badawczą, dotyczącą charakterystyki i oceny zdolności do sorpcji wybranych kationów metali ciężkich przez dwa biosorbenty (1 \rightarrow 3)- α -D-glukany i chitynę. Badania są wartościowe i nowatorskie i warte kontynuowania, ponieważ w mojej ocenie w przypadku obu biosorbentów dalsza modyfikacja metodyki ich izolacji oraz warunków sorpcji powinna przynieść dalszy przyrost ich zdolności sorpcyjnych. Prezentowane w rozprawie wyniki stwarzają podstawę do takich badań. Opublikowanie prac w renomowanych czasopismach naukowych świadczy zarówno o ważności podjętej tematyki, poprawności metodycznej, jak i bardzo wysokim poziomie merytorycznym prac.

Z powyższych powodów pracę przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Jednakże w trakcie czytania pojawiły się pewne pytania o charakterze dyskusyjnym.

- W jaki sposób przygotowano próbki biosorbentów po adsorpcji kationów metali ciężkich do liofilizacji próbek, aby uniknąć ich desorpcji a jednocześnie zapobiec wytrącaniu się soli metali na powierzchni biosorbentów?
- Czy jest możliwe wykonanie depigmentacji w taki sposób, aby umożliwić otwarcie terminalnego pierścienia glukozaminy (np. w środowisku zasadowym) i utlenienie grupy karbonylowej przy pierwszym węglu do grupy karboksylowej, ewentualnie nawet utlenienie grupy hydroksylowej przy 6 węglu glukozaminy do grupy karboksylowej? Zwiększyłyby to w istotny sposób kationową pojemność wymienną zmodyfikowanej chityny. Czy można podobne utlenianie przeprowadzić również w przypadku terminalnej glukozy w (1→3)- α -D-glukanach?
- Czy planuje Pani dalsze prace dotyczące sorpcji kationów metali ciężkich na badanych sorbentach? Jeżeli tak, to w jakim kierunku powinny być one według Pani kontynuowane?

Podsumowanie

Rozprawę doktorską mgr Katarzyny Złotko oceniam bardzo wysoko. Uzyskane wyniki są oryginalne i cenne. Stanowią one podstawę do dalszych badań o celu aplikacyjnym: otrzymaniu wydajnych i trwałych a jednocześnie biodegradowalnych sorbentów kationów metali ciężkich na bazie (1→3)- α -D-glukanów i chityny. Uzyskane wyniki należy uznać za stanowiące istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej rolnictwo i ogrodnictwo. Doktorantka dowiodła, że jest dobrze przygotowana do prowadzenia prac naukowo-badawczych z użyciem najnowszej aparatury naukowej i dysponuje szeroką wiedzą w zakresie tematyki przedstawionej w rozprawie. Biorąc pod wagę dużą wartość naukową rozprawy, ważność podjętej tematyki i fakt, że badania zostały opublikowane w postaci serii publikacji o łącznym współczynniku IF = 12.758 i łącznej punktacji MEiN 300 pkt., stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Złotko spełnia wymogi stawiane pracom na stopień doktora zawarte w art. 13.1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r (Dz. U. z 2016 r. poz. 882 ze zm.). W związku z tym wnoszę o jej przyjęcie przez Radę Naukową Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN oraz o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o

ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Złotko.

T. Paszko

Tadeusz Paszko

