Warszawa, 01.12.2022

dr hab. inż. Małgorzata M. Jaworska, profesor uczelni
Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej
Politechnika Warszawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mg inż. Tomasza Machałowskiego pt. „ Naturally formed chitin-based scaffolds: characterization, functionalization, and practical utility"
Promotor: prof. dr hab. inż. Teofil Jesionkowski
Promotor pomocniczy: prof. Hermann Ehrlich

1. Treść i zakres rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa poświęcona jest otrzymywaniu oraz wykorzystaniu naturalnie uformowanych matryc chitynowych otrzymywanych z gąbek morskich oraz z naskórka pająków, jako gotowego produktu aplikacyjnego lub półproduktu do dalszego funkcjonalizowania. Przestrzenne struktury chitynowe izolowano nowatorską metodą z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego, a następnie testowano jako rusztowania dla komórek zwierzęcych, nośnik dla enzymów, czynnik antybakteryjny czy sorbent dla związków ropopochodnych. Praca ma charakter interdyscyplinarny łącząc technologię chemiczną i inżynierię materiałową z biologią i biochemią.

Chityna jest zaraz po celulozie najbardziej rozpowszechnionym biopolimerem. Jest biokompatybilna, porowata, nietoksyczna, a na dodatek pochodzi ze źródeł odnawialnych. Chityna jest także bardzo stabilnym, niereaktywnym biopolimerem i z tego względu jest rzadziej stosowana niż chitozan (deacetylowana pochodna chityny). Brak reaktywności oraz duża chemiczna i biologiczna stabilność może być zaletą, gdyż daje możliwość wykorzystania chityny jako naturalnego rusztowania dla komórek czy też jako nośnika dla enzymów. Ten właśnie aspekt został zauważony i wykorzystany w badaniach Doktoranta. Zaznaczyć pragnę, że badania podjęte przez Doktoranta uważam za ważne zadanie badawcze, istotne z punktu widzenia zarówno naukowego jak i aplikacyjnego a dodatkowo o dużej dozie nowości.

Zakres rozprawy obejmował opracowanie nowej, nieinwazyjnej metody izolacji chityny z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego, scharakteryzowanie wyizolowanych, naturalnych (gąbki, wylinki pająków) rusztowań chitynowych z wykorzystaniem nowoczesnych technik analitycznych, sprawdzenie możliwości wykorzystania otrzymanych rusztowań do hodowli komórek zwierzęcych, nośników do immobilizacji enzymów, czynnika bakteriobójczego w filtrach do wody, sorbentów dla zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi.

Praca podzielona została na dwie części: część teoretyczną (7 podrozdziałów) oraz część eksperymentalną (9 rozdziałów uzupełnionych spisem literatury). W części teoretycznej Doktorant omówił zagadnienia biomimetyki, rusztowania 3D do hodowli komórkowych (Rozdział 2.1.1.), wykorzystanie rusztowań w inżynierii tkankowej (Rozdział 2.1.2.), materiały inspirowane biologią wykorzystywane w ochronie środowiska (Rozdział 2.1.3.) oraz przedstawił ogólną charakterystykę chityny, metody jej izolacji (Rozdział 2.2.1.), jej potencjał aplikacyjny (Rozdział 2.2.2.), własności sorpcyjne chityny oraz chitozanu (Rozdział 2.2.3.), i omówiono gąbki morskie oraz pająki jako źródło naturalnych, chitynowych rusztowań 3D.

W części doświadczalnej przedstawiono cel i zakres pracy (Rozdział 3.), materiały i metody wykorzystywane w badaniach (Rozdział 4), własności strukturalne oraz fizykochemiczne chitynowych rusztowań wyizolowanych z gąbek (Rozdział 5), wykorzystanie otrzymanych rusztowań do hodowli komórek zwierzęcych (Rozdział 6.), wykorzystanie rusztowań wstępnie mineralizowanych do hodowli komórek kostnych (Rozdział 7.), wykorzystanie rusztowań do immobilizacji lakazy (Rozdział 8.), sprawdzenie możliwości wykorzystania struktur chitynowych do oczyszczania wody (Rozdział 9.), scharakteryzowanie oraz wykorzystanie struktur chitynowych wyizolowanych z naskórków pająków w inżynierii tkankowej oraz jako sorbent dla związków ropopochodnych (Rozdział 11.). Pracę zakończono syntetycznym podsumowaniem (Rozdział General Summary).

Praca ma dobra konstrukcję i prowadzi czytelnika przez zagadnienia omawiane i badane w pracy. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo skrupulatne przedstawienie metod badawczych ze szczególnym uwzględnieniem metod izolacji chityny oraz metod wykorzystywanych do jej charakteryzacji fizykochemicznej.

Cel i zakres rozprawy zostały wyraźnie określone.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska p. mgr inż. Tomasza Machałowskiego liczy 222 strony z rysunkami, tabelami, streszczeniem (w j. polskim i angielskim), spisem literatury (408 pozycji). Praca w całości została napisana w j. angielskim.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska miała na celu wykorzystanie promieniowania mikrofalowego do izolacji naturalnych, 3D struktur chitynowych oraz sprawdzenie możliwości ich wykorzystania w inżynierii komórkowej, enzymologii, uzdatnianiu wody do picia czy ochronie środowiska.

Przedstawiona do oceny praca jest bardzo obszerna i porusza szereg istotnych, nowatorskich zagadnień. Doktorant swoje zainteresowania skierował na chitynę, a w szczególności na naturalne struktury 3D chityny. Chityna na skalę przemysłowa otrzymywana jest w chwili obecnej z pancerzy skorupiaków. Postać handlowa chityny to płatki o różnej granulacji. Taka postać chityny wymaga dalszego przetwarzania (najczęściej do chitozanu i następnie budowania struktur 3D z chitozanu) w celu otrzymania odpowiednich struktur przestrzennych takich jak gąbki czy rusztowania dla komórek. Zaproponowana w 2009r. przez prof. Ehrlicha metoda separacji chitynowych struktur 3D z gąbek morskich była nowatorska, gdyż pozwalała na bezpośrednie otrzymanie struktur przestrzennych tego polimeru. Doktorant kontynuując te badania zmodyfikował metodę separacji chityny wykorzystując do tego promieniowanie mikrofalowe. Zaproponowana metoda znacznie skraca

czas izolacji z 7 dni do 1 godz. i dodatkowo znacznie ograniczając ilość stosowanych odczynników chemicznych często szkodliwych dla środowiska. Struktury wyizolowane z gąbek *Aplysinidae fistulartis, Aplysindae archeri* oraz *Aplysindae aerophoba* zostały następnie scharakteryzowane z wykorzystaniem nowoczesnych technik analitycznych; określono porowatość struktur chitynowych, ich przestrzenne ułożenie, moduł Younga, strukturę chemiczną z wykorzystaniem widma FTIR i ESI-MS, charakterystykę rozkładu termicznego z wykorzystaniem TGA/DTG. Analizy te wykazały, że promieniowanie mikrofalowe nie ma negatywnego wpływu na wyizolowane struktury chitynowe, gdyż wszystkie charakterystyki były identyczne z tymi dla α-chityny otrzymywanej metodą klasyczną.

Otrzymane z gąbek (*Aplysinidae fistulartis)* chitynowe struktury 3D były w następnym etapie sprawdzane pod kątem cytotoksyczności z wykorzystaniem komórek fibroblastów Balb/3T3, fibroblastów ludzkich oraz komórek keratynocytów. We wszystkich przypadkach wykazano brak toksyczności rusztowań chitynowych a także, wykazano dobrą adhezję oraz wzrost wszystkich testowanych komórek na takich rusztowaniach. Pozytywne wyniki badań z fibroblastami oraz komórkami skóry skłoniły Doktoranta do podjęcia badań nad wykorzystaniem struktur chitynowych jako rusztowań dla komórek osteoblastów. Struktury chitynowe zostały wstępnie zmineralizowane powierzchniowo z wykorzystaniem hemolimfy ślimaków *Cornu aspersum*. Zaproponowana metoda biomineralizacji *ex-vivo* jest metodą nowatorską pozwalającą na depozycję węglanów na powierzchni rusztowania chitynowego, co polepszyło mechaniczne własności struktury, wpłynęło na chropowatość jej powierzchni, polepszyło zwilżalność, co w efekcie końcowym polepszyło własności rusztowań dla komórek kostnych.

Kolejnym etapem badań Doktoranta było wykorzystanie chitynowych struktur 3D jako nośników dla enzymów. W badaniach wykorzystano lakazę immobilizowaną metodą adsorpcji. Doktorant uzyskał wysoką wydajność immobilizacji (ok. 91%) zachowując jednocześnie wysoką aktywność uzyskanego preparatu. Preparat z immobilizowaną lakazą był następnie wykorzystany do usuwania tetracykliny z roztworów wodnych. Zbadano wpływ temperatury, pH środowiska, stężenia antybiotyku oraz możliwość wielokrotnego użycia preparatu. Doktorant wykazał, że usuwanie tetracykliny jest procesem złożonym, na który składa się adsorpcja antybiotyku na powierzchni chityny oraz rozkład antybiotyku w wyniku reakcji enzymatycznej. Oba procesy zachodzą równolegle.

Struktura przestrzenna izolowanej z gąbek chityny daje możliwość wykorzystania biopolimeru jako gotowego do użycia wypełnienia kolumn do uzdatniania wody pitnej czy oczyszczania ścieków. Gęste upakowanie włókien chitynowych, duże rozwinięcie powierzchni przy jednoczesnej dużej porowatości stwarza warunki małych oporów przepływu. Z tego względu kolejne badania Doktoranta ukierunkowane były na sprawdzenie możliwości wykorzystania chityny z gąbek jako materiału filtracyjnego w procesach uzdatniania wody. Chityna była funkcjonalizowana jonami srebra w celu polepszenia jej własności bakteriostatycznych i bakteriobójczych. Doktorant wykorzystał metodę redukcji azotanu srebra za pomocą glukozy uzyskując silnie związaną z powierzchnią warstwę Ag/AgBr. Doktorant scharakteryzował otrzymany po modyfikacji materiał oraz określił jego własności bakteriostatyczne z wykorzystaniem bakterii gram(+) *Bacillus subtilis* oraz bakterii gram(-) *Escherichia coli*. Wyniki porównano z komercyjnie dostępnym preparatem zawierającym jony

srebra o nazwie handlowej Suprasorb® A+Ag. Materiał opracowany przez Doktoranta ograniczył wzrost bakterii *E. coli*, lecz nie zahamował wzrostu bakterii *B. subtilis* i okazał się skuteczniejszy niż preparat komercyjny, który nie zahamował wzrostu żadnego z badanych mikroorganizmów.

Ostatnim obszarem badań Doktoranta było wyizolowanie i scharakteryzowanie chitynowych struktur 3D otrzymanych z naskórka pająków *Caribena versicolor*. Struktury chitynowe izolowano wcześniej zaproponowaną metodą z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego. Badania wykazały, że wyizolowana chityna ma konformację α-chityny, określono także jej porowatość, zwilżalność oraz stopień krystaliczności. Struktury chitynowe były badane pod kątem możliwości wykorzystania ich jako rusztowań dla komórek kardiomiocytów ludzkich (iPSC-CMs) i uzyskano obiecujące wyniki. Struktury chitynowe wyizolowane z naskórków pająków *Avicularia sp. Peru purple* wykazywały hydrofobowy charakter i z tego względu sprawdzono możliwość ich zastosowania jako sorbentów dla związków ropopochodnych uzyskując znaczną pojemność sorpcyjną (16 g/g chityny). Doktorant potwierdził, że chityna wyizolowana z powłok pająków może być wykorzystywana zarówno w inżynierii tkankowej jak i w ochronie środowiska.

Stwierdzam, że mgr inż. Tomasz Machałowski zrealizował wyznaczone w pracy cele, wykazał się umiejętnością planowania i właściwej realizacji prac badawczych, a wyizolowane przestrzenne struktury chitynowe mogą być wykorzystane jako rusztowania dla komórek zwierzęcych, nośniki dla enzymów, materiał filtracyjny wykorzystywany w uzdatnianiu wody czy sorbent dla związków ropopochodnych. Doktorant wykazał się znajomością nowoczesnych technik analitycznych takich jak: SEM, FTIR, TGA, DMA, AFM, NMR, XRD, BET, czy μ-CT. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że praca stanowi kompletny, zamknięty cykl przemyślanych badań: od opracowania metody izolacji, poprzez szczegółową i różnorodną charakteryzację wyizolowanego materiału chitynowego, aż do testowania potencjalnych obszarów zastosowania wyizolowanych naturalnych struktur 3D. Przedstawiona praca jest bardzo obszerna i potwierdza dużą wiedzę Doktoranta w tematyce prowadzonych badań. Praca posiada wiele elementów nowości.

Oceniając aspekty poznawcze rozprawy doktorskiej, za istotne osiągnięcia Doktoranta można uznać:

- opracowanie nowatorskiej metody izolowania z gąbek morskich oraz z naskórków pająków przestrzennych, naturalnych struktur chitynowych,
- scharakteryzowanie otrzymanych struktur z wykorzystaniem nowatorskich metod analitycznych (te rodzaje chityny są rzadko opisywane w literaturze),
- opracowanie metody biomineralizacji powierzchni włókien chityny węglanem wapnia z wykorzystaniem hemolimfy ślimaków,
- opracowanie metody pokrywania włókien chityny kompleksem Ag/AgBr
- wykazanie możliwości wykorzystania otrzymanych naturalnych lub zmodyfikowanych rusztowań chitynowych do hodowli komórek fibroblastów, komórek keratynocytów, komórek osteoblastów, komórek kardiomiocytów ludzkich,
- wykazanie możliwości wykorzystania zmodyfikowanych srebrem struktur chitynowych do uzdatnianiu wody do picia

- wykazanie możliwości wykorzystania otrzymanych struktur jako nośnika dla lakazy i wykorzystanie tego preparatu do skutecznego rozkładu/sorpcji tetracykliny,
- wykazanie możliwości wykorzystania struktur 3D jako sorbentu dla związków ropopochodnych.

W trakcie czytania pracy nasuwają się jednak pewne uwagi, które wymagają komentarza lub dodatkowych wyjaśnień:

1. Lakaza immobilizowana była na powierzchni struktury chitynowej metoda adsorpcji. Jest to metoda o najsłabszych oddziaływaniach między enzymem a nośnikiem i często dochodzi do desorpcji enzymu w wyniku zmiany siły jonowej roztworu czy zmiany pH środowiska. Czy badano desorpcję enzymu przy określaniu stabilności preparatu?

2. Na jakiej podstawie przyjęto, że reakcja lakazy z ABTS jest zgodna z kinetyką Michaelisa-Menten?

3. Tabela 11: w Tabeli zaprezentowano porównanie parametrów kinetycznych (K_M i V_{MAX}) enzymu natywnego oraz enzymu immobilizowanego. Choć szybkość maksymalna V_{MAX} często jest określana jako parametr w równaniu Michaelisa-Menten to jest to wielkość zależna od ilości użytego enzymu. Doktorant nie określił czy szybkość odnosi się do preparatu immobilizowanego enzymu (stężenie enzymu + nośnika) czy do ilości samego enzymu immobilizowanego na powierzchni nośnika i odniesionego do objętości układu reakcyjnego. W pracy nie podano wartości stałej k_3, która jest miarą obiektywną pozwalającą na porównanie enzymu immobilizowanego z enzymem natywnym.

4. Rys. 58.: obserwowany na rysunku spadek aktywności enzymu wraz ze wzrostem stężenia tetracykliny w mieszaninie reakcyjnej może być efektem inhibicji substratowej a nie przeładowania enzymu cząsteczkami substratu („enzyme overloading with the substrate molecules")

Uwagi o charakterze edytorskim:

1. Rys. 25.: rysunek przestawia porównanie widma FRIR chityny wyizolowanej z gąbek oraz standardu α-chityny, lecz w pracy nie wyjaśniono jaka chityna była stosowana jako standard.

2. Tabela 9., Tabela 12.: średnią wielkość porów podano w μm a powinna być w nm (np. podana średnia wielkość porów wynosiła 1300 μm = 1,3 mm a zdjęcia prezentują włókna chityny o średnicy ok. 100 μm)

Uwagi przedstawione powyżej, poczynione z obowiązku recenzenta, nie umniejszają wartości poznawczej rozprawy i są tematami do dalszej dyskusji.

3. Wniosek końcowy

Praca nie budzi zastrzeżeń zarówno pod względem formalnym, jaki i merytorycznym. Została sformułowana poprawnie i wnosi bardzo wiele elementów nowości naukowej. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat metod izolacji oraz potencjalnych zastosowań chityny otrzymywanej z gąbek morskich oraz naskórków pająków. Opracowanie stanowi oryginalny dorobek autora.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska p. mgr inż. Tomasza Machałowskiego spełnia wymagania formalne w odniesieniu do pracy doktorskiej, odpowiada wymogom Ustawy o Tytule i Stopniach Naukowych. Zwracam się, zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Poznańskiej o przyjęcie pracy oraz dopuszczenie p. mgr inż. Tomasza Machałowskiego do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim. Jednocześnie wysoko oceniając przedstawioną do oceny pracę wnioskuję o jej wyróżnienie.

dr hab. inż. Małgorzata Jaworska